



Università degli Studi di Genova

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

Dottorato in Scienze Pediatriche – XXXIII ciclo

Curriculum Medicina Perinatale

Tesi di dottorato

Valutazione dei fattori di rischio precoci di patologia cerebrale nel neonato prematuro: fattori perinatali e nuovi biomarkers su liquido amniotico e amnion

Tutor:

Prof. Luca A. Ramenghi

Candidata:

Dott.ssa Laura Costanza De Angelis

Anno Accademico 2020/2021

Ai miei genitori

PREFAZIONE

Il progetto del mio dottorato è incentrato sulla patogenesi e sui fattori di rischio precoci delle lesioni cerebrali neonatali che, nonostante i progressi della medicina perinatale, continuano ad essere causa di disabilità e alterato neurosviluppo nel bambino nato pretermine. Durante questo percorso ho avuto la possibilità di approfondire la mia conoscenza sulle lesioni cerebrali nel prematuro, sull'autoregolazione cerebrale come fattore modulante il danno della sostanza bianca cerebrale e sui metodi più all'avanguardia per la ricerca di nuovi biomarker per l'identificazione precoce di condizioni di rischio, in questo caso legati alla patologia placentare. La comprensione dei meccanismi patogenetici e la possibilità di identificare i neonati più a rischio di danno cerebrale trova ragione nella possibilità di prevenire, laddove possibile, le condizioni che ne aumentano il rischio e di favorire interventi neuroprotettivi e riabilitativi precoci.

Tra i fattori perinatali, ampio spazio è stato dato alle lesioni istologiche placentari e alla loro possibile influenza sullo sviluppo delle lesioni cerebrali più precoci (emorragia intraventricolare e cerebellare) del neonato pretermine: lo studio, che ha coinvolto 286 neonati pretermine, ha confermato che la presenza di un'infezione/inflamazione endouterina gioca un ruolo importante nello sviluppo di lesioni emorragiche associate alla prematurità. Da questo studio, che ha visto una stretta collaborazione tra figure professionali di diversi ambiti (neonatologi, anatomopatologi, radiologi, statistici) è stato prodotto un articolo scientifico, per il quale ho attivamente partecipato in tutte le fasi del suo sviluppo e della sua stesura. A tal proposito ringrazio il dottor Parodi, neonatologo esperto, che mi ha aiutato in tutte le fasi del progetto mostrando estrema precisione e accuratezza nel guidarmi tra referti di risonanze ed esami placentari. Ringrazio inoltre il professor Ezio Fulcheri, anatomopatologo ed esperto placentologo, per avermi spiegato (e rispiegato... e rispiegato...) con passione rudimenti e rifiniture dell'esame istopatologico placentare e fatto comprendere la sua importanza nel contesto della fisiopatologia neonatale.

Per approfondire poi meglio il ruolo della corioamnionite come fattore di rischio di danno cerebrale del neonato pretermine abbiamo effettuato, in collaborazione con il Laboratorio di Fisiopatologia dell'uremia del Gaslini, diretto dal Dott. Candiano, una preliminare ricerca dei possibili biomarker sulla membrana amniotica come primo passo per la successiva identificazione di una o più proteine dosabili per valutare lo stato

dell'infiammazione intrauterina. Anche in questo caso, sono stata circondata da persone brillanti e appassionate del proprio lavoro, che mi hanno permesso di scoprire una branca della medicina di laboratorio che non avevo avuto modo di approfondire in precedenza.

Per capire invece l'influenza dell'autoregolazione cerebrale sul rischio di danno cerebrale, da febbraio a luglio 2019, con marito e figli, ho effettuato un periodo di permanenza all'estero presso il Morgan Stanley Children Hospital di New York, presso il Laboratorio del Prof. Vadim Ten, neonatologo ricercatore da anni impegnato negli studi sull'effetto istologico e biochimico dell'esposizione del tessuto cerebrale all'insulto ipossico. A lui e alla sua equipe, in particolare al dott. Andrej Sosunov vanno i miei più sentiti ringraziamenti, per avermi guidata nel mondo della ricerca preclinica sul modello animale, per avermi insegnato a comprendere il fascino della fisiopatologia delle malattie cerebrali del neonato pretermine, e per aver notevolmente migliorato le mie performance di english listening and conversation. Inoltre, le quotidiane attività di formazione proposte dall'equipe neonatologica sono state estremamente importanti per la mia crescita professionale e culturale.

Nel corso di questi tre anni di dottorato ho avuto la possibilità di implementare l'attività di ricerca con la professione clinica presso il reparto di Terapia Intensiva Neonatale e presso il Nido del Gaslini. Ho affinato la mia esperienza clinica in sala parto e nella gestione del nato pretermine, cogliendo in questo modo gli effetti diretti delle osservazioni emerse nelle varie ricerche. Nelle guardie in Patologia Neonatale e al Nido ho lavorato insieme a medici, infermieri e OSS meravigliosi che, ognuno con la propria esperienza, mi hanno aiutato e sostenuto nel lavoro clinico e hanno condiviso con me preziosi aneddoti, racconti e stralci di vita ospedaliera. A loro tutti va un affettuoso grazie.

Un sincero ringraziamento al dott. Bellini che mi ha aiutato a portare a termine numerose pubblicazioni, insegnandomi tutto quello che so sull'arte di scrivere un paper e di pubblicarlo in tempi ragionevoli. Un affettuoso ringraziamento anche alla dott.ssa Mariya Malova, che ha condiviso con me gioie e dolori di questo importante percorso.

Ringrazio di cuore il Professor Luca Ramenghi per avermi accolta nel suo team e per avere reso possibile questo mio traguardo. Per avermi sostenuta anche nei momenti più difficili e impegnativi e per aver sempre ascoltato le mie idee, le mie domande (spesso insistenti) e i miei dubbi clinici (questi ultimi per fortuna anche risolvendoli).

Infine, un pensiero affettuoso va a mio marito, che mi ha sopportata e mantenuta in questi tre anni.

Genova, 09/01/2021

ABSTRACT

Background. La nascita pretermine si accompagna ad un aumentato rischio di sviluppare un danno neurologico, che può presentarsi con diversi quadri patologici, in relazione all'entità del danno e all'età gestazionale del neonato. L'identificazione precoce dei fattori di rischio di danno neurologico nella popolazione dei nati prematuri è di fondamentale importanza per migliorare l'assistenza al neonato sia durante il ricovero in Terapia Intensiva Neonatale, sia per guidare e personalizzare il follow-up post-dimissione. Mentre diversi studi hanno evidenziato un significativo ruolo dei fattori postnatali precoci sullo sviluppo di tali lesioni, il ruolo dell'ambiente intrauterino e della patologia placentare sullo sviluppo di tali lesioni non è ancora stato del tutto chiarito. L'analisi istologica placentare può fornire indicazioni preziose circa la possibile eziopatogenesi delle lesioni cerebrali neonatali e, nella sua componente fetale, rappresenta un ottimo tessuto di partenza per l'identificazione di nuovi biomarker.

Metodi. Lo studio, che ha interessato 289 neonati pretermine < 32 settimane gestazionali ricoverati alla nascita presso la U.O. Terapia Intensiva Neonatale tra gennaio 2012 e ottobre 2017, ha valutato il ruolo di numerosi fattori di rischio perinatali sullo sviluppo di lesioni cerebrali della prematurità (emorragia intraventricolare, emorragia cerebellare, lesioni della sostanza bianca), diagnosticate mediante RM al termine di età corretta. È stata inoltre effettuata la ricerca di un'associazione tra tali lesioni e le caratteristiche istopatologiche placentari, rivalutate secondo la recente classificazione di Amsterdam. Inoltre, su un sottogruppo di tali soggetti è stata eseguita l'analisi proteomica con spettrometria di massa del liquido amniotico e dell'amnion prelevati alla nascita, analizzata tramite Weight Gene

Co-expression Network Analysis (WGCNA). Per l'analisi statistica dei fattori di rischio è stata effettuata una analisi descrittiva dei dati mediante l'utilizzo del t test di Student per le variabili continue e il test χ^2 o il Fisher's exact test per le variabili categoriche. È stata inoltre effettuata una analisi univariata dei fattori considerati e successivamente multivariata considerando unicamente le variabili statisticamente significative o borderline all'analisi univariata.

Risultati. Lo studio ha evidenziato una significativa correlazione tra lesioni cerebrali e alcune caratteristiche perinatali, confermando le osservazioni di studi precedenti (presenza di emorragia cerebellare [OR: 8.14], ventilazione meccanica nelle prime 72 ore [OR: 2.67] e pervietà del dotto di Botallo trattata farmacologicamente [OR: 2.6]. Dopo correzione per l'età gestazionale, uno dei fattori di rischio indipendenti più importanti nel determinare il rischio neurologico, e nello specifico, di emorragia intraventricolare è risultata essere la corioamnionite coinvolgente il versante materno di stadio 1 [OR: 2.92] e stadio 3 [OR: 4], mentre non emersa alcuna correlazione tra reperti placentari e altre lesioni cerebrali. Dallo studio di proteomica è emerso un pattern di co-espressione proteica caratteristico in caso di corioamnionite interessante il versante fetale della placenta [ME brown: indice di Pearson 0.9; $p < 0.05$]. L'identificazione delle componenti proteiche presenti in tale pool potrebbe portare all'identificazione di uno o più nuovi marker di corioamnionite che dosato nel sangue neonatale, o possibilmente, in quello materno potrebbe essere utilizzato per guidare una precoce valutazione del rischio di lesione cerebrale nel neonato pretermine.

Conclusioni. Dalla combinazione di entrambi gli studi emerge la evidente complessità del quadro di infiammazione della diade madre/feto che consta della corioamnionite istologica (solo di recente definita) e della meno oggettivabile, addirittura se non solo sospetta,

corioamnionite clinica (febbre materna). Il fattore più importante per capire il coinvolgimento del futuro neonato, del suo essere più o meno “pre-condizionato” dallo stato materno, più o meno pronò a sviluppare patologie neonatali, è la presenza di FIRS (Fetal Inflammatory Response Syndrome) che è verosimile debba prevedere l’infiammazione della membrana amniotica e presentare valori di proteomica significativamente alterati sul versante fetale a dimostrazione del coinvolgimento di questa componente. Rimane indiscutibile la multifattorialità delle lesioni cerebrali ed il preponderante ruolo dell’età gestazionale nella loro insorgenza. Tali osservazioni, insieme alla doverosa continua ricerca di biomarker plausibili come il nostro studio ha cercato di dimostrare, sottolineano l’importanza della ottimizzazione del timing del parto prematuro, nel quale il bilancio tra rischi di una nascita troppo pretermine ed i benefici dall’escludere il feto/neonato da un ambiente ostile, quale quello gravidico in corso di infiammazione, vanno ponderati con estrema accortezza.

Indice

1	Introduzione	9
1.1	La nascita pretermine	9
1.2	Complicanze della prematurità	12
2	Lesioni neurologiche associate alla prematurità	15
3	Emorragia intraventricolare	18
3.1	Incidenza e timing	19
3.2	Patogenesi e fattori di rischio	19
3.3	Neuroimaging	25
3.4	Outcome neuroevolutivo	28
4	Emorragia cerebellare	30
4.1	Incidenza e timing	32
4.2	Patogenesi e fattori di rischio	33
4.3	Neuroimaging	36
4.4	Outcome neuroevolutivo	37
5	Lesioni della sostanza bianca cerebrale	39
5.1	Patogenesi e fattori di rischio	39
5.2	Leucomalacia periventricolare	41
5.3	Lesioni puntate della sostanza bianca	44
6	La placenta	48
6.1	Lesioni placentari e cerebrali nel neonato pretermine	52
7	Fattori di rischio precoci per lesioni emorragiche	57
7.1	Metodi	57
7.2	Analisi statistica	61
7.3	Risultati	62
8	Ricerca di nuovi biomarkers su amnion	68
8.1	Obiettivo dello studio	68
8.2	Metodi	68
8.3	Risultati	70
9	Autoregolazione cerebrale e danno neurologico	72
9.1	Studio preclinico su modello murino	73
10	Discussione	76
11	Bibliografia	84

1. INTRODUZIONE

1.1 La nascita pretermine

La nascita prematura è definita dall'organizzazione mondiale della sanità (OMS) come la nascita che avviene prima delle 37 settimane di età gestazionale ¹. Globalmente si stima che circa il 60-70% delle nascite pretermine avvenga tra le 34 e le 36 settimane (lieve prematurità), il 20% circa tra le 32 e le 33 settimane (prematurità moderata), il 15% tra le 28 e le 32 settimane (prematurità severa), mentre il restante 5% prima delle 28 settimane gestazionali (prematurità estrema) ².

I neonati posso essere classificati, oltre che sulla base dell'età gestazionale alla nascita, anche in base al peso neonatale, che identifica sub-popolazioni di neonati pretermine con caratteristiche cliniche e prognostiche relativamente omogenee:

- Extremely Low Birth Weight (ELBW): neonati con peso < 1000 g;
- Very Low Birth Weight (VLBW): neonati con peso < 1500 g;
- Low Birth Weight (LBW): neonati con peso compreso tra 1500 g e 2500 g.

La nascita pretermine rappresenta la più frequente causa di morte in epoca neonatale ed espone il neonato ad un aumentato rischio di complicanze a lungo termine ³. Se ne stima una prevalenza globale di circa il 10%, con ampia variabilità tra Stati, dal 5% in molti Paesi europei fino al 18% in alcuni Paesi dell'Africa. Nonostante il progressivo miglioramento delle cure intensive neonatali abbia ridotto notevolmente la mortalità dei neonati prematuri,

la presenza di disabilità neurologiche si attesta ancora tra il 5 e il 10% dei neonati sopravvissuti, percentuale che gradualmente aumenta al ridursi dell'età gestazionale ^{4,5}.

In circa il 30-35% dei casi la nascita pretermine è dovuta all'induzione iatrogena del travaglio di parto o all'esecuzione di un taglio cesareo elettivo nei casi in cui la prosecuzione della gravidanza potrebbe nuocere al neonato o alla madre. Nel 45% dei casi si verifica invece l'insorgenza di travaglio di parto pretermine e nel 25-35% dei casi si ha invece una prematura rottura delle membrane ⁶. La relativa stabilità dell'incidenza delle nascite pretermine nei Paesi sviluppati sembra dovuta all'aumento dei parti pretermine indotti e al relativo aumento delle gravidanze multiple conseguenti alle tecniche di riproduzione assistita ⁷.

La patogenesi del parto pretermine non è stata ancora del tutto compresa, sebbene si ipotizzi possa essere secondario ad un'attivazione precoce dei meccanismi fisiologici che inducono il parto sia l'esito di un processo patologico che interferisce con la gravidanza ⁸. Sulla base di studi condotti sul modello animale, l'insorgenza del parto in condizioni fisiologiche può essere attribuita a tre diversi meccanismi:

- riduzione dei livelli di progesterone, dovuti all'aumento dell'attività placentare della 17- α idrossilasi a sua volta indotta dall'aumento della secrezione di cortisolo da parte del feto ^{9,10}, i ridotti livelli di progesterone provocano il rilascio di prostaglandine, le quali danno inizio poi ad una cascata di eventi culminanti nel parto ¹¹. A questo proposito, nonostante non vi sia una chiara riduzione dei valori sierici di progesterone all'avvicinarsi del parto, una riduzione di tale ormone a livello locale o nel numero dei suoi recettori potrebbe essere un meccanismo plausibile nell'inizio del travaglio;

- aumento dei livelli di ossitocina, meccanismo ipotizzato per la sua capacità di favorire le contrazioni uterine, sebbene un evidente rialzo delle concentrazioni ematiche di tale ormone prima del parto non sia stato osservato;
- attivazione della decidua, che nel neonato a termine sembra essere dovuta all'attivazione del sistema paracrino feto-deciduale, mentre in caso di parto pretermine potrebbe essere indotta da un sanguinamento uterino o da un evento infettivo.

Sebbene siano numerosi i fattori associati alla nascita pretermine, tra i quali infezioni, infiammazione, ischemia utero-placentare, sovradistensione uterina, stress, una causa precisa non è sempre identificata. Diversi fattori di rischio si ritiene possano avere un ruolo nell'indurre la nascita pretermine, sia materni sia fetali (tabella 1) ^{12,13}.

Tabella 1. Principali fattori di rischio per parto pretermine.

Condizioni materne	Attuale gravidanza
Familiarità per prematurità	Fumo
Basso livello socioeconomico	Stress psicologico
Età materna	Metrorragia
Etnia	Fecondazione assistita
Depressione	Gravidanza multipla
Malnutrizione	Accorciamento della cervice uterina
Patologie materne	Alterazioni genetiche fetali
Anomalie uterine	Malformazioni congenite
Conizzazione cervice uterina	Infezioni (genitourinarie o extragenitali)
Precedente parto pretermine	Alterazione quantitativa del liquido amniotico
Pregressi aborti	Corioamnionite

Tra i vari fattori di rischio, l'infezione batterica intrauterina rappresenta uno dei meccanismi più frequenti ed importanti associati alla nascita pretermine ¹⁴⁻¹⁶. Il riconoscimento di un microorganismo patogeno da parte dei pattern-recognition receptors

(toll-like receptors) provoca il rilascio di mediatori infiammatori, tra cui chemochine, citochine (IL-8, IL-1 β) e TNF α . Le endotossine microbiche insieme alle citochine pro-infiammatorie stimolano la produzione di prostaglandine, di ulteriori mediatori dell'infiammazione e di enzimi degradanti la matrice. Mentre le prostaglandine stimolano la contrattilità uterina, la degradazione della matrice extracellulare a livello delle membrane fetali predispone alla loro precoce rottura ¹⁷. Alcuni studi suggeriscono che l'infezione intrauterina sia responsabile fino al 40% delle nascite premature spontanee, ma questa percentuale potrebbe addirittura essere maggiore, come dimostrato da studi che hanno utilizzato tecniche di biologia molecolare ^{18,19}. Inoltre, più la nascita premature avviene precocemente, più la frequenza di infezioni endouterine sembra elevata. Tra le 21 e le 24 settimane gestazionali la maggior parte delle nascite premature spontanee sono associate alla presenza di una corioamnionite istologica, rispetto ad un 10% a 35-36 settimane ²⁰.

1.2 Complicanze della prematurità

A causa della loro immaturità, i neonati pretermine presentano un elevato rischio di andare incontro a complicanze a breve e a lungo termine ^{21,22}. È chiaro che l'età gestazionale sia il fattore chiave nel predire l'outcome neonatale. Prima della diffusione della ventilazione assistita, avvenuta intorno agli anni '70, i neonati nati prima delle 28 settimane raramente sopravvivevano, e la prognosi dei neonati pretermine di età gestazionali successive era comunque gravata da un'elevata mortalità, soprattutto per insufficienza respiratoria. Con il progressivo miglioramento dell'assistenza neonatale, la diffusione di terapie estremamente efficaci quali il surfattante esogeno, i corticosteroidi prenatali e il continuo miglioramento

delle tecniche di ventilazione neonatale, l'aspettativa di vita è notevolmente aumentata anche nelle fasce di età gestazionale più basse.

L'imaturità del sistema polmonare rappresenta la principale complicanza della prematurità. La totalità dei neonati con prematurità estrema (< 28 settimane) e la maggior parte dei neonati con severa prematurità (28-32 settimane gestazionali) sviluppa la sindrome da distress respiratorio neonatale e necessità di assistenza ventilatoria dalla nascita sia con tecniche non invasive sia con modalità ventilatorie invasive²³. L'imaturità polmonare, soprattutto nei neonati ELBW, può esitare in displasia broncopolmonare, una condizione cronica associata a significativa morbidità respiratoria nei primi anni di vita, che va tuttavia riducendosi nel tempo, con alterazione della funzionalità polmonare che tende a persistere fino all'età adulta²⁴. La termoregolazione è spesso insoddisfacente nei neonati VLBW, e spesso l'alterata transizione dalla circolazione fetale a quella neonatale può provocare shunt patologici con alterazioni di circolo che compromettono la perfusione sistemica e necessitano di terapia farmacologica o correzione chirurgica. Frequente è inoltre la retinopatia della prematurità, causata da un'alterata crescita dei vasi retinici.

A causa dell'imaturità renale, anche il bilancio idro-elettrolitico è compromesso nei neonati pretermine, soprattutto durante le prime settimane di vita, e le alterazioni metaboliche, in particolare di glicidi, lipidi e proteine risulta alterata, in particolar modo nei neonati di peso estremamente basso.

L'imaturità del tratto digerente può causare una ridotta tolleranza all'alimentazione con frequenti episodi di stipsi, ristagno gastrico e tensione addominale fino allo sviluppo di quadri clinici di gravità estrema come l'enterocolite necrotizzante²⁵. A causa della immaturità del sistema immunitario, in associazione alle numerose manovre invasive a cui sono sottoposti, i neonati prematuri presentano un rischio significativamente

aumentato di infezioni che spesso tendono ad essere generalizzate in quadri di sepsi. A causa dell'imaturità renale, anche il bilancio idro-elettrolitico è compromesso nei neonati pretermine, soprattutto durante le prime settimane di vita, e le alterazioni metaboliche, in particolare di glucidi, lipidi e proteine risulta alterata, in particolar modo nei neonati di peso estremamente basso ²⁶.

2. LESIONI NEUROLOGICHE ASSOCIATE ALLA PREMATURITA'

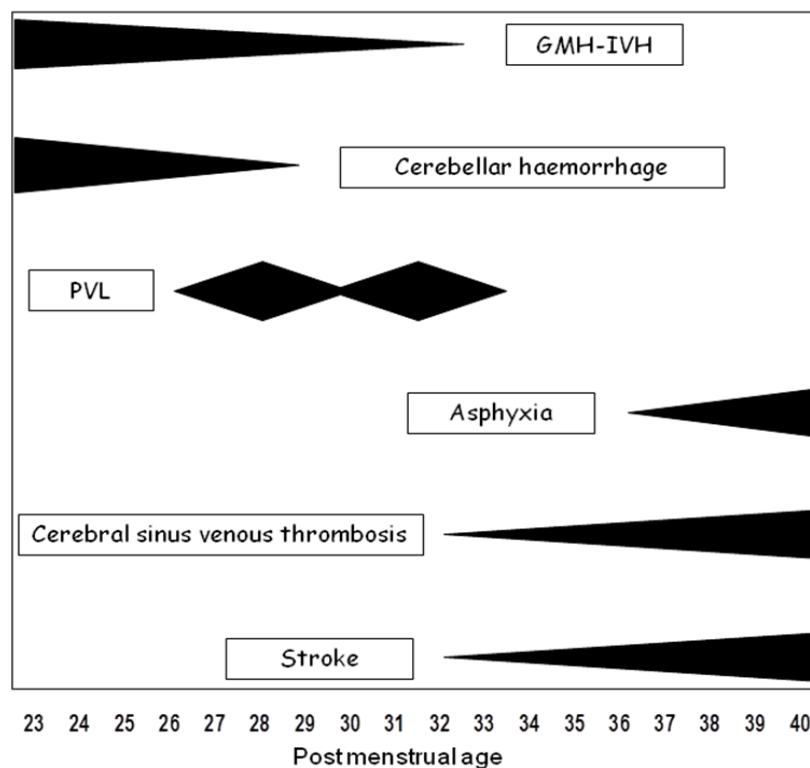
Le complicanze principali in termini di frequenza ed impatto sulla qualità della vita sono però rappresentate dalle sequele neurologiche, la cui gravità è inversamente proporzionale all'età gestazionale e al peso alla nascita. Alcune lesioni cerebrali sono evidenti fin dall'inizio del periodo neonatale, individuabili mediante esame ecografico transfontanellare, altre invece si rendono evidenti alla risonanza magnetica (RM) cerebrale eseguita nelle settimane successive alla nascita.

L'eziologia delle lesioni cerebrali nel neonato prematuro è complessa, e le ipotesi maggiormente accreditate vedono l'insulto ipossico e le alterazioni della perfusione cerebrale come principali meccanismi patogenetici responsabili di tali lesioni. La nascita pretermine espone infatti l'immaturo cervello neonatale a numerosi cambiamenti, quali repentine variazioni di pressione arteriosa, differente supporto nutritivo, alterati livelli ormonali ed esposizione a tensioni di ossigeno maggiori. In aggiunta a tali condizioni, l'esposizione a fattori potenzialmente nocivi quali infiammazione, infezioni, stress, dolore e farmaci nel periodo neonatale predispone allo sviluppo di danno cerebrale in questa fragile popolazione.

Poiché la severità delle lesioni aumenta con il diminuire dell'età gestazionale, non è irragionevole pensare che l'immatunità nella regolazione della circolazione cerebrovascolare possa essere un fattore primario nel determinare la gravità della lesione cerebrale ²⁷ (figura 1).

Per comprendere la vulnerabilità cerebrale del nato pretermine, è essenziale considerare le diverse fasi dello sviluppo cerebrale. Il primo trimestre di gestazione è caratterizzato da intensa proliferazione e migrazione neuronale, mentre durante il secondo, predominano la proliferazione delle cellule gliali e la morte cellulare programmata. L'ultimo trimestre di gestazione è caratterizzato dallo sviluppo della connettività, quindi predominano lo sviluppo assonale e dendritico e la sinaptogenesi. La vulnerabilità cerebrale selettiva ad una data età gestazionale è probabilmente determinata dai requisiti metabolici locali insieme a specifiche caratteristiche cellulari.

Figura 1. Frequenza delle lesioni cerebrali in relazione all'età gestazionale. Immagine tratta da Sannia et al. 2015²⁸



La mielinizzazione precoce delle strutture cerebrali centrali, come il tronco cerebrale e il talamo, è presente fino alla 26° settimana. Un'ulteriore fase di mielinizzazione avviene nel braccio posteriore della capsula interna fino alla fine della gestazione ²⁹. Nei neonati con prematurità estrema, le lesioni più tipiche sono rappresentate dall'emorragia della matrice germinativa – emorragia intraventricolare (GMH-IVH) e dall'emorragia cerebellare, quest'ultima recentemente valorizzata grazie al sempre più diffuso utilizzo della RM cerebrale neonatale. Con l'aumento di età gestazionale, l'incidenza di tali lesioni tende a decrescere progressivamente ed a 30-32 settimane di gestazione rappresentano un evento insolito e possibilmente associato a fattori di rischio specifici (ad es. trombofilia).

Le lesioni della sostanza bianca rappresentano invece le lesioni più frequenti del neonato prematuro, con prevalenza maggiore a partire dalla 28° - 30° settimana post-mestruale. Nonostante nella sua forma più severa, la leucomalacia periventricolare, la sua incidenza si sia nettamente ridotta nelle ultime decadi, le lesioni puntate della sostanza bianca rappresentano una lesione tutt'oggi molto comune nel neonato pretermine.

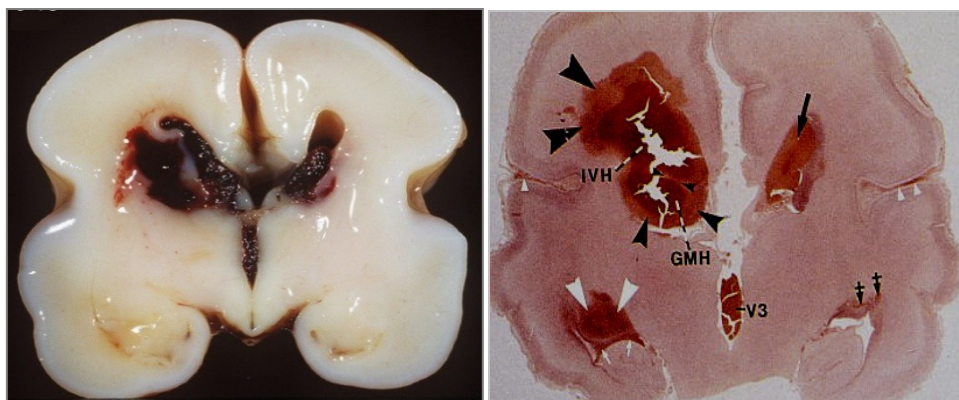
Di seguito verranno trattate in dettaglio le principali lesioni cerebrali associate a prematurità.

3. EMORRAGIA INTRAVENTRICOLARE

L'emorragia della matrice germinativa - emorragia intraventricolare (GMH-IVH) rappresenta una complicanza frequente nel neonato pretermine (figura 2 e 3), ed ha come possibili dirette conseguenze la distruzione della matrice germinativa, l'infarto emorragico periventricolare, la porencefalia e l'idrocefalo postemorragico, che si manifesta in circa il 25-50% dei neonati con GMH-IVH di grado severo ^{30,31}.

Essa è comunemente asintomatica e spesso l'unico segno clinico è una riduzione acuta dell'ematocrito. Meno frequentemente può manifestarsi con letargia, apnea, alterazioni del tono muscolare, ed ancora più raramente con apnea severa, convulsioni, alterazioni del sensorio, postura decerebrata o decorticata, ipotensione, fino al decesso. Tuttavia, dato che la maggior parte dei neonati è asintomatica, l'esecuzione periodica dell'ecografia cerebrale è mandatoria nei neonati pretermine con età gestazionale < 32 settimane.

Figura 2. Preparato istologico che evidenzia la presenza di GMH-IVH bilaterale di III grado, a destra complicato dalla presenza di infarto emorragico periventricolare.



3.1 Incidenza e timing

L'incidenza complessiva della GMH-IVH tra i neonati con peso alla nascita inferiore a 1500 g è del 20-25%, e nei due terzi dei casi si tratta di forme lievi o moderate. Le forme severe, sebbene più rare, hanno un'incidenza più elevata tra i neonati con prematurità estrema.

In circa la metà dei casi, l'emorragia intraventricolare si verifica nel primo giorno di vita, un ulteriore 25% nel secondo giorno e 15% nel terzo giorno di vita. Un terzo delle emorragie intraventricolari aumenta di dimensioni e la maggiore estensione si raggiunge 3-5 giorni dopo l'insorgenza dell'emorragia. Nonostante il periodo di vulnerabilità a tali lesioni si estenda fino al 4°-5° giorno di vita, diversi studi hanno evidenziato come più della metà delle GMH-IVH avvenga entro le prime 6-8 ore dalla nascita, in un momento di estrema instabilità clinica del neonato pretermine, specialmente ad età gestazionali più basse³²⁻³⁴.

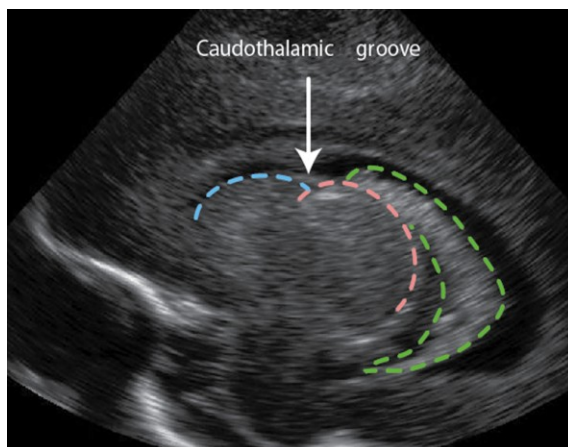
3.2 Patogenesi e fattori di rischio

Più del 90% di tutte le GMH-IVH nei neonati pretermine origina dalla matrice germinativa subependimale, localizzata tra il nucleo caudate e il talamo a livello o leggermente posteriormente rispetto al forame di Monro (figura 3)^{35,36}.

La matrice germinativa subependimale rappresenta inizialmente il sito di proliferazione dei precursori gliali e neuronali destinati agli strati profondi della corteccia cerebrale (figura 4). Dopo la 20° settimana di gestazione e fino alla 25°-27° settimana tale area non solo è gliogenica, ma genera attivamente anche neuroni, in particolare interneuroni

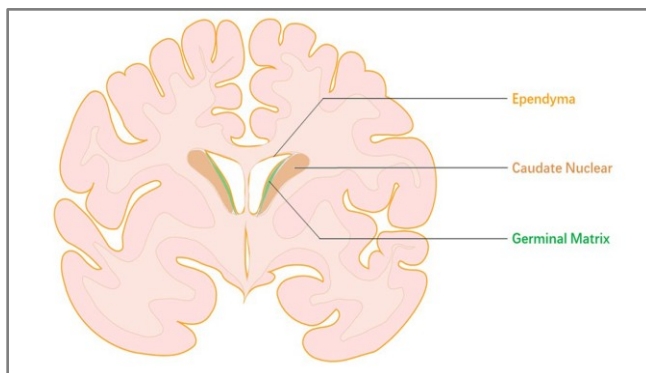
GABAergici e sembra essere la principale fonte di neuroni degli strati più superficiali della corteccia cerebrale ^{37,38}.

Figura 3. Sezione ecografica sagittale che evidenzia il solco caudo-talamico, sede più frequente delle emorragie della matrice germinativa. In azzurro il nucleo caudato, in rosa il talamo e in verde il plesso corioideo.



A 24 settimane la migrazione della maggior parte dei neuroni corticali è avvenuta, mentre iniziano a formarsi gli alberi dendritici e le connessioni sinaptiche. La matrice germinale persiste come struttura altamente vascolarizzata fino a 32-34 settimane per poi subire una progressiva involuzione fino al termine di gravidanza ^{31,39}.

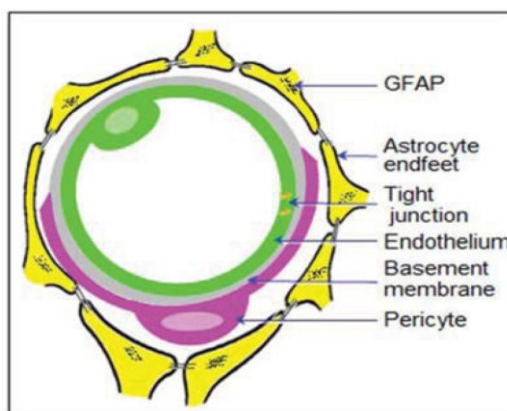
Figura 4. Anatomia periventricolare: la matrice germinativa è un sottile strato di sostanza grigia (in verde) localizzata subito al di sotto dell'ependima. Da Luo J, et al. 2018 ⁴⁰



Durante questo periodo di rapida crescita, la matrice germinativa richiede un elevato apporto sanguigno, cosa che però la rende vulnerabile allo sviluppo di sanguinamenti. La significativa vulnerabilità al sanguinamento della matrice germinativa è dovuta sia all'elevata densità vascolare e la rapida angiogenesi che la caratterizza, sia all'intrinseca fragilità della barriera ematoencefalica (figura 5). caratterizzata dai seguenti fattori ^{41,42}:

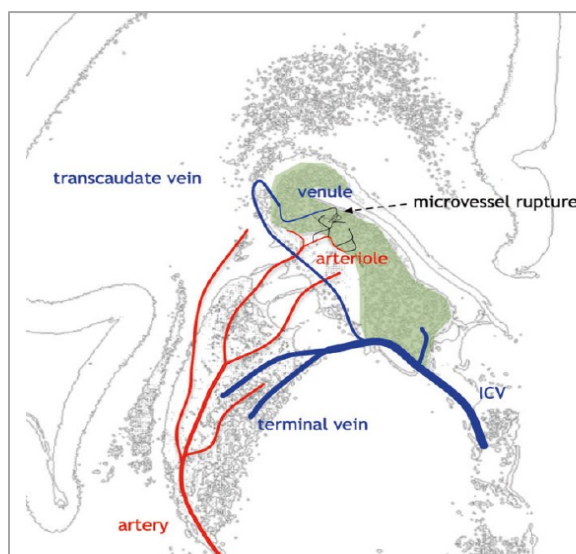
- fragilità della parete vascolare per il ridotto numero di periciti, cellule perivascolari che avvolgono l'endotelio ⁴³.
- ridotta quantità di fibronectina della lamina basale, componente fondamentale della barriera ematoencefalica ⁴⁴.
- ridotta espressione della proteina fibrillare acida della glia (GFAP), componente fondamentale del citoscheletro, nei piedi degli astrociti, che a loro volta conferiscono stabilità alla barriera ematoencefalica e ne controllano la stabilità ⁴⁵.
- anatomia tortuosa del letto venoso della matrice germinativa predispone alla stasi venosa e, di conseguenza, all'infarto emorragico della sostanza bianca periventricolare ^{46,47}.

Figura 5. Rappresentazione della barriera ematoencefalica e dei suoi principali componenti, immaturi nel neonato pretermine. Immagine tratta da Ballabh 2014 ⁴⁸



Sebbene i primi studi di Pape and Wigglesworth ⁴⁹ abbiano suggerito che il sito più comune di sanguinamento fosse il letto capillare della matrice germinativa, studi successivi sono concordi nell'indicare le vene terminali come principale sede di origine dell'emorragia (figura 6) ^{50,51}.

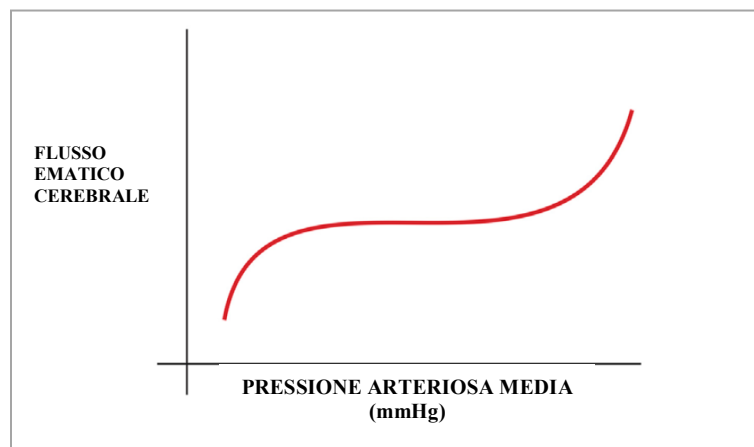
Figura 6. Vascolarizzazione della matrice germinativa, da Parodi et al. 2020



Accanto alla fragilità vascolare della matrice germinativa, sono stati ipotizzati due meccanismi patogenetici principali alla base della GMH-IVH, quali le repentine variazioni del flusso ematico cerebrale e l'ostruzione all'efflusso venoso cerebrale ^{52,53}. In presenza di alterazioni della pressione arteriosa, il flusso ematico cerebrale è mantenuto costante grazie al sistema di autoregolazione cerebrale, la cui azione è classicamente descritta da una curva sigmoidale (figura 7), in cui all'interno di un range pressorio il flusso ematico cerebrale si mantiene costante, mentre a valori estremi (sia inferiori sia superiori) tale sistema perde la capacità di regolare il flusso ematico. Il funzionamento del sistema di autoregolazione cerebrale è garantito dalla modulazione del tono vascolare esercitata da diversi fattori, sia

locali sia sistemici quali la pressione parziale di CO₂ e di O₂, e il sistema nervoso autonomo.

Figura 7. Funzionamento del sistema di autoregolazione cerebrale in base ai valori di pressione arteriosa media



Un deficit dell'autoregolazione cerebrale è stato dimostrato in neonati con IVH, e diversi sono i fattori, sia endogeni che esogeni, che possono alterare tale sistema^{54,55}. Sono numerosi i fattori di rischio pre-, peri- e post-natali che si ritiene possano essere associati all'insorgenza di GMH-IVH. Alcuni di questi però hanno un ruolo contrastante a seconda dei diversi studi (tabella 3)⁵⁶⁻⁵⁹.

Tabella 3. Fattori di rischio associati a GMH-IVH.

Fattori di rischio prenatali e perinatali	Fattori di rischio post-natali
Bassa età gestazionale	Sindrome da distress respiratorio neonatale
Basso peso neonatale	Ipossiemia
Assenza di profilassi steroidea prenatale	Ipo/ipercapnia
Corioamnionite	Pneumotorace
Travaglio di parto (anche esitante in taglio cesareo)	Sepsi precoce
Trasporto neonatale	Terapia con inotropi
Rianimazione neonatale	Terapia con sodio bicarbonato
Apgar 5' < 5	Pervietà del dotto arterioso
pH da funicolo < 7	Convulsioni
	Trombocitopenia

Accanto ai fattori clinici, anche la componente genetica è stata presa in considerazione, in particolare per quanto riguarda geni implicati nella coagulazione, nell'infiammazione e nella struttura vascolare ^{60,61}. Per quanto riguarda la coagulazione, diversi polimorfismi associati a trombofilia sono stati studiati, ma i più frequentemente considerati sono la variante del fattore V di Leiden, la variante G2021A della protrombina e i polimorfismi della metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR). La variante del fattore V ha dato risultati contrastanti: alcuni autori riportano un aumentato rischio di GMH-IVH, altri ne riportano invece un ruolo protettivo nei confronti delle emorragie di grado severo, altri ancora non hanno trovato alcuna correlazione ⁶². È stata però dimostrata un'associazione con le forme di GMH-IVH tardive (oltre le 96 ore dalla nascita) ⁶³.

L'iperomocisteinemia associata ai polimorfismi in posizione 677 e 1298 del gene MTHFR espongono ad un maggior rischio di danno endoteliale e trombofilico ⁶⁴. In un recente studio europeo, la mutazione CC o CA in posizione 1298 sono stati associati allo sviluppo di GMH-IVH. La mutazione della protrombina non è invece stata associata ad un aumento del rischio di GMH-IVH ⁶⁴. Infine, è stata recentemente suggerita l'influenza di polimorfismi genetici del gene codificante per l'enzima Vitamina K epossido reduttasi e del fattore VII sul rischio di sviluppare GMH-IVH, ma sono necessari ulteriori studi per confermare tale dato ⁶⁵.

Anche varianti dei geni codificanti per mediatori dell'infiammazione, tra cui l'IL-1 β , l'IL-6 e il TNF- α , sono stati implicati nello sviluppo di GMH-IVH nel pretermine. Alcuni studi hanno rilevato un'associazione tra i polimorfismi 511C>T, l'allele 31 C dell'IL-1 β e un rischio aumentato di emorragia. I polimorfismi 174C dell'IL-6 e 308A del TNF- α hanno invece dato risultati contrastanti a seconda degli studi.

Infine, alcuni geni implicati nello sviluppo vascolare quali il COL4A1 e il polimorfismo 785T>C del gene promotore dell'ossido nitrico sintetasi endoteliale hanno dimostrato di conferire un rischio aumentato di GMH-IVH ⁶⁶⁻⁶⁸, mentre la variante RS8192287 della superossidodismutasi-3 è risultato essere un fattore protettivo indipendente per emorragia nel neonato pretermine ⁶⁹.

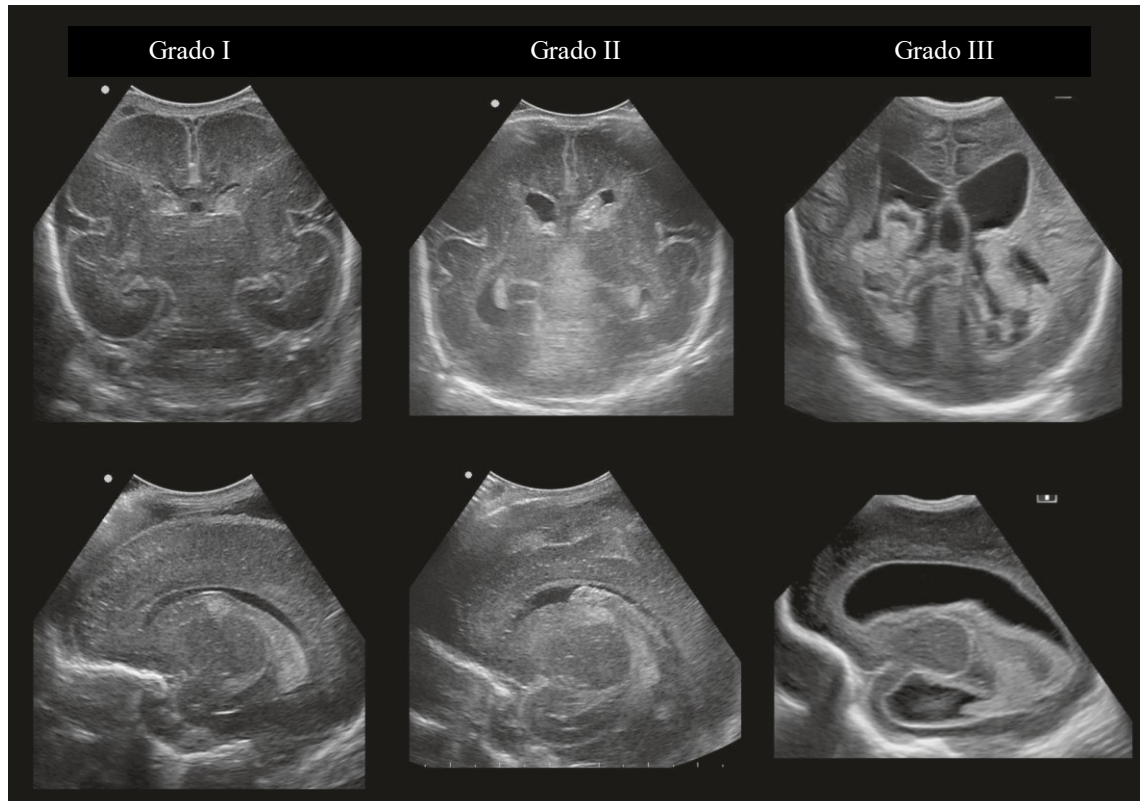
3.3 Neuroimaging

L'ecografia cerebrale, eseguita precocemente di routine dopo la nascita, permette di valutare, attraverso la finestra acustica della fontanella anteriore, la presenza delle emorragie intraventricolari, di classificarle in base alla severità e di monitorarne l'evoluzione. Il più diffuso sistema classificativo è stato sviluppato da Papile nel 1978 (Tabella 4).

Tabella 4. Sistema classificativo di severità dell'emorragia intraventricolare nel neonato secondo Papile ⁷⁰.

Classificazione di Papile	
Grado 1	Emorragia limitata alla matrice germinativa
Grado 2	Presenza di sangue endoventricolare senza dilatazione ventricolare
Grado 3	Presenza di sangue endoventricolare con dilatazione ventricolare
Grado 4	Emorragia con infarto venoso emorragico periventricolare

Figura 8: immagini ecografiche transfontanellari coronali e sagittali che mostrano emorragie intraventricolari di grado I, II e III, rispettivamente. Immagine modificata da Parodi et al. 2020⁷¹



Accanto all'ecografia cerebrale, la RM cerebrale rappresenta la metodica di eccellenza per lo studio del sistema nervoso centrale, per l'elevata capacità di definizione anatomica e la possibilità di effettuare studi non solo di natura prettamente anatomica ma anche funzionale e metabolica. In molti centri, la RM cerebrale viene ormai proposta ai neonati VLBW una volta raggiunto il termine di età corretta, per completare lo studio delle strutture cerebrali periodicamente effettuato tramite l'ecografia cerebrale dalla nascita. Inoltre, dato che gli effetti della presenza di GMH-IVH sullo sviluppo cerebrale sono tuttora oggetto di studio, la possibilità di valutare l'estensione morfo-funzionale del danno

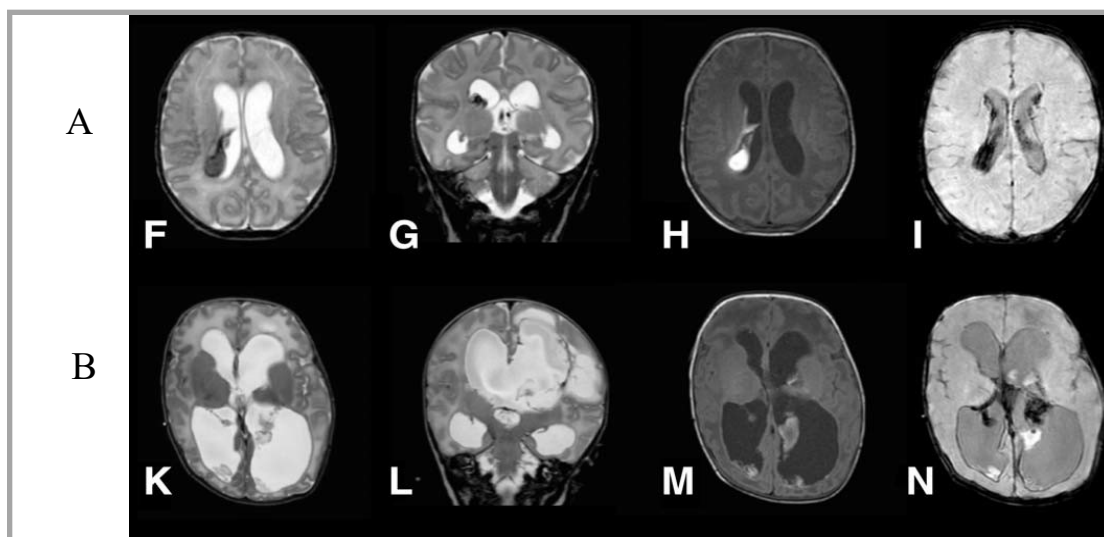
inizia ad essere possibile tramite l'implementazione delle tecniche di RM convenzionale con tecniche funzionali.

Le principali alterazioni cerebrali associate a GMH-IVH fino ad oggi studiate sono le seguenti:

- riduzione del volume corticale all'età corretta del termine nei neonati pretermine con GMH-IVH (in assenza di dilatazione ventricolare post-emorragica o coinvolgimento parenchimale) ⁷²;
- riduzione del volume cerebellare in presenza di GMH-IVH sopratentoriale, come risultante di un concomitante danno cerebellare o come l'effetto del sangue circolante nel liquor sullo sviluppo cerebellare ⁷³;
- alterazioni microstrutturali nella sostanza bianca valutate tramite sequenze di diffusion tensor imaging (DTI) in neonati con GMH-IVH di basso grado (I e II); in particolare è stata dimostrata una vulnerabilità selettiva età gestazionale dipendente di diverse aree cerebrali (alterazioni microstrutturali della sostanza bianca periventricolare nei neonati < 28 settimane e con coinvolgimento della sostanza bianca sottocorticale nel neonato pretermine ≥ 29 settimane) ⁷⁴;
- accumulo di depositi di emosiderina all'interno del parenchima cerebrale, non solo a livello della sostanza bianca adiacente al sanguinamento, ma anche in sede controlaterale, valutati tramite la tecnica di quantitative susceptibility mapping (QSM)

⁷⁵.

Figura 9. Immagini RM di neonato con GMH-IVH di grado lieve: F= scansione T2 assiale, G = scansione T2 coronale, H = scansione T1 assiale, I = immagine SWI; B: neonato con GMH-IVH di IV grado: K = scansione T2 assiale, L = scansione T2 coronale, M = scansione T1 assiale, N = immagine SWI; immagine modificata da tortora et al. 2018 ⁷⁵



3.4 Outcome neuroevolutivo

La determinazione della prognosi neurologica nei nati prematuri con GMH-IVH è molto complessa, data l'eterogeneità delle alterazioni neurologiche e dei conseguenti deficit neurocomportamentali nelle età successive. Le lesioni cerebrali del prematuro possono esitare in importanti deficit motori e cognitivi o in più lievi disordini della coordinazione e delle performance cognitive, in relazione al tipo, alla sede e alla gravità del danno.

È noto da tempo che la GMH-IVH di alto grado (stadio III e IV) aumenta il tasso di mortalità e morbidità a breve e a lungo termine e rappresenta un fattore prognostico negativo per lo sviluppo neuro-cognitivo del bambino. In merito alle conseguenze delle GMH-IVH di basso grado (stadio I e II) esistono invece evidenze contrastanti. Mentre i primi studi non avevano evidenziato significativi deficit neurologici, studi più recenti hanno

invece dimostrato che anche sanguinamenti di basso grado sono associati alla presenza di alterazioni microstrutturali a livello della sostanza bianca periventricolare e ad un rischio aumentato di compromissione dello sviluppo neuro-cognitivo a due anni di età corretta^{76,77}.

4. EMORRAGIA CEREBELLARE

Durante il terzo trimestre di gravidanza, il cervelletto va incontro a un rapido sviluppo. Dalla 27° alla 40° settimana gestazionale esso quintuplica il suo volume, proseguendo poi il suo sviluppo nei mesi successivi. Durante questo periodo, infatti, la corteccia cerebellare incrementa progressivamente la sua stratificazione e, con i successivi ripiegamenti e la formazione di circonvoluzioni superficiali, la sua superficie aumenta di più di trenta volte (da 448 mm² a 15.200 mm²)^{78,79}.

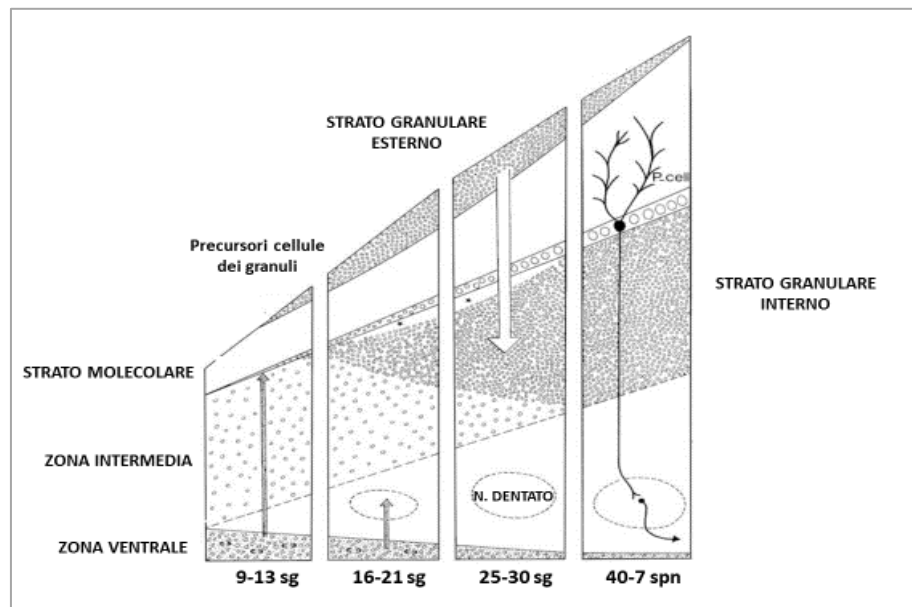
Lo sviluppo istologico del cervelletto inizia intorno alla 4° settimana gestazionale, quando si differenziano due neuroepiteli proliferativi, la zona ventricolare e il labbro rombico, da cui hanno origine tutti i neuroni cerebellari^{80,81}. Dalla zona ventricolare originano i neuroni GABAergici, inibitori, distinti in neuroni di proiezione (cellule del Purkinje dello strato molecolare e neuroni dei nuclei intrinseci nucleo-olivari) e gli interneuroni (cellule di Golgi dello strato granulare interno, cellule stellate e le cellule dei canestri dello strato molecolare della corteccia).

Il labbro rombico dà invece origine a neuroni glutamatergici, progenitori degli strati granulari e dei neuroni dei nuclei intrinseci del cervelletto. I primi migrano e formano lo strato granulare esterno, che raggiunge il suo massimo sviluppo attorno alla 25° settimana gestazionale (figura 10). Successivamente, le cellule dello strato granulare esterno migrano radialmente lungo le fibre gliali di Bergmann andando a formare lo strato

granulare interno. I precursori dei nuclei intrinseci invece migrano inizialmente sulla superficie piaie per poi raggiungere i nuclei profondi ⁸².

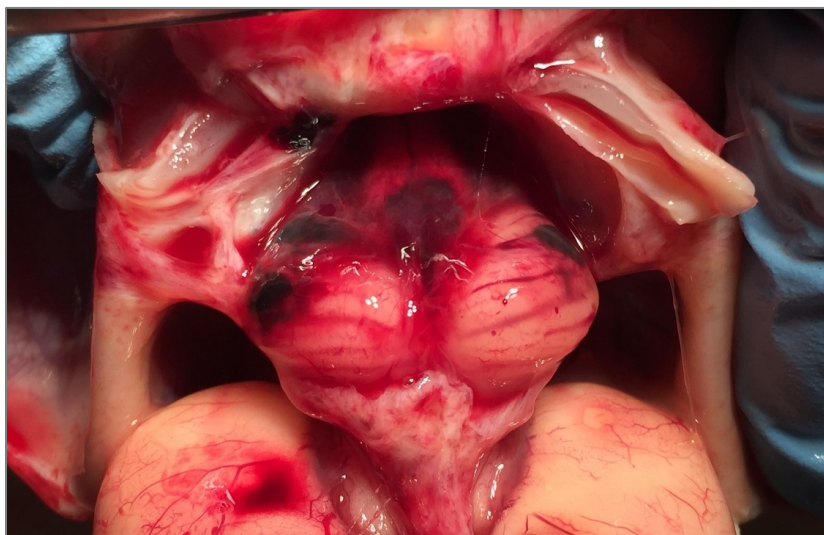
Dal labbro rombico originano inoltre i precursori cellulari che, migrando sulla superficie ventrolaterale del ponte e sulla porzione rostrale del bulbo, formano i nuclei basilari del ponte e il nucleo olivare inferiore da cui origina la gran parte delle fibre “rampicanti”, che si estendono nella sostanza bianca cerebellare fino a raggiungere i dendriti delle cellule del Purkinje intorno alla 34° settimana ⁸³. Dalla 40° settimana lo sviluppo cerebellare decelera progressivamente e lo strato granulare esterno si riduce gradualmente fino a scomparire intorno all’anno di vita, mentre lo strato granulare interno raggiunge il suo massimo sviluppo ⁸⁴.

Figura 10. Fasi dello sviluppo della corteccia cerebellare dal primo trimestre di gravidanza a 7 settimane di età postnatale. La direzione di migrazione cellulare è indicata dalle frecce. Sg: settimane gestazionali; spn: settimane post-natali. Modificata da ten Donkelaar et al. 2009 ⁸⁵



Durante questo periodo di rapido sviluppo, il cervelletto è particolarmente suscettibile agli insulti dovuti alle conseguenze della nascita pretermine (figura 11) ⁸⁶. Questa può comportare infatti sia l'insorgenza di lesioni focali (emorragie o infarti cerebellari) sia un alterato sviluppo dell'architettura cerebellare (ipoplasia cerebellare) ⁸⁷.

Figura 11. Emorragie cerebellari multiple localizzate a livello dello strato granulare esterno. Immagine da autopsia di cervelletto di neonato pretermine a 23 settimane gestazionali. Per gentile concessione del Prof. Ezio Fulcheri, IG Gaslini



4.1 Incidenza

Le più frequenti e meglio descritte lesioni cerebellari sono le emorragie cerebrali, che si presentano in due diverse forme a seconda della gravità del sanguinamento:

- Emorragie cerebellari estese, identificabili con l'esame ultrasonografico attraverso la fontanella posteriore, che hanno una prevalenza tra l'1 e il 9% a seconda dell'età gestazionale considerata;

- Microemorragie (< 4 mm), solitamente non apprezzabili allo studio ecografico ma visibili alla RM encefalo, che raggiungono un'incidenza di molto superiore, fino al 30%, dei neonati pretermine;

Recentemente, Parodi et al. hanno rivisitato questa classificazione, tenendo conto anche delle lesioni extra-cerebellari, definendo tre gradi di emorragia cerebellare ⁸⁸: (1) emorragie microscopiche, diagnosticabili esclusivamente con la risonanza magnetica (diametro di pochi millimetri); (2) emorragie massive, coinvolgenti più del 30% del parenchima cerebellare, facilmente diagnosticabili con l'ecografia; (3) emorragie limitate, che rappresentano delle lesioni intermedie e che potrebbero essere visibili anche all'ecografia.

L'incidenza delle emorragie cerebellari varia significativamente a seconda degli studi. In particolare, si è assistito ad un relativo aumento di tale patologia, non solo per l'aumentata sopravvivenza di neonati ad età gestazionali estreme, ma anche, verosimilmente, per il sempre più diffuso utilizzo della risonanza magnetica.

4.2 Patogenesi e fattori di rischio

Le emorragie cerebellari si presentano all'ecografia come processi a forma lenticolare oppure semilunare all'interno del parenchima sano, con localizzazione più frequente a livello emisferico e unilaterale. Meno frequentemente interessano il lobulo vermiario o bilateralmente entrambi gli emisferi. Dopo circa 4-8 settimane esitano di norma in processi atrofici del parenchima, focali nelle lesioni unilaterali o generalizzati nelle lesioni bilaterali. Tale lesione è spesso diagnosticata in associazione a lesioni

sopratentoriali, in particolare alle emorragie intraventricolari e alle lesioni della sostanza bianca cerebrale, con cui si pensa condividano, almeno in parte, i meccanismi patogenetici.

L'eziopatogenesi delle emorragie cerebellari è verosimilmente multifattoriale. Il fattore di rischio più importante per lo sviluppo di tali lesioni è rappresentato dall'età gestazionale estrema, periodo in cui il cervelletto raggiunge il 20-25% del volume finale e in cui lo strato granulare esterno presenta il suo picco di crescita ⁸⁹. Oltre all'età gestazionale, sono state avanzate diverse ipotesi sui possibili fattori responsabili di un aumento del rischio di emorragia (tabella 5) ⁹⁰⁻⁹²

Tabella 5. Principali fattori associati allo sviluppo di emorragia cerebellare.

Fattori prenatali
Alterazione del tracciato cardiocografico
Corioamnionite
Taglio cesareo urgente
Bassa età gestazionale
Basso peso neonatale
Fattori perinatali
Basso Apgar a 1 e 5 minuti
Intubazione alla nascita
Temperatura all'ammissione < 36°C
Fattori postnatali
Pervietà del dotto arterioso
Ipotensione
Enterocolite necrotizzante
Sepsi
Broncodisplasia polmonare
Emorragia intraventricolare
Acidosi
Inotropi
Durata della ventilazione meccanica

Le maggiori compagini vascolari del cervelletto si localizzano nella matrice germinativa subependimale del quarto ventricolo, nelle piccole anastomosi venose sulla

superficie dello strato granulare esterno e soprattutto nel letto vascolare localizzato fra corteccia cerebellare e sostanza bianca, i cui piccoli rami si staccano dall'arteria cerebellare posteriore inferiore, ed entrano in contatto con lo strato granulare interno ⁸⁴.

Si presume che le emorragie cerebellari focali ed emisferiche originino dallo strato granulare esterno, che rappresenta una zona con elevata attività proliferativa e angiogenica, anche se alcuni autori più recentemente indicano una possibile origine dallo strato granulare interno, nella zona di interfaccia alla sostanza bianca ⁹³. Le emorragie del verme potrebbero invece originare dalla parte germinativa residua subependimale, nella zona ventricolare, sul tetto del quarto ventricolo ⁸⁰.

Emorragie estese possono provocare idrocefalo da ostruzione all'efflusso liquorale se esercitano una compressione a livello delle pareti del quarto ventricolo, e spesso esitano in lesioni atrofiche più o meno estese e in un'ipoplasia estesa anche alle strutture controlaterali. Le lesioni a questo stadio maturativo, infatti, alterano non solo il trofismo dell'organo, ma anche lo sviluppo dei circuiti sinaptici cerebellari con le altre aree cerebrali ⁹⁴.

A questo proposito, uno dei principali meccanismi responsabili dell'atrofia cerebellare sembra derivare dall'accumulo di prodotti ematici nei tessuti e sulla superficie cerebellare, che interferiscono con la normale maturazione delle strutture cerebellari ⁹⁵.

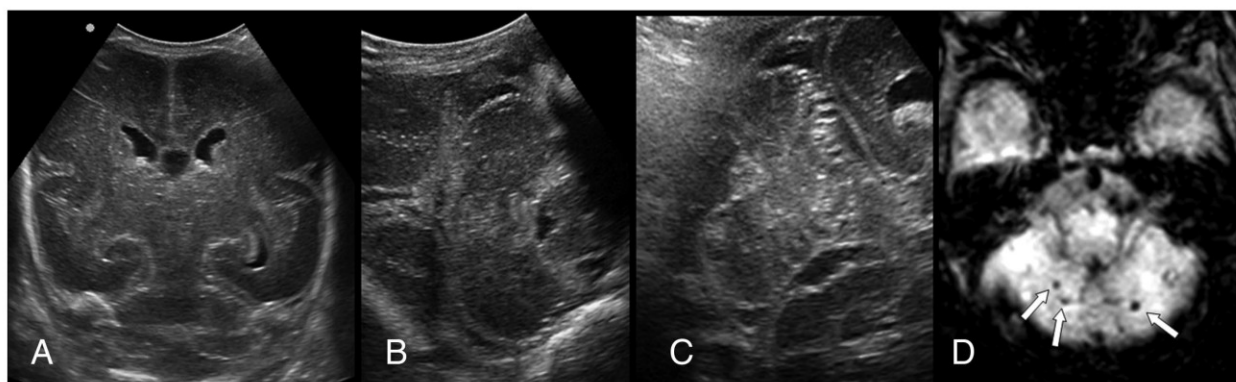
Inoltre, è stato ipotizzato che anche emorragie estrinseche che provocano un accumulo di sangue e cataboliti del ferro nel liquor, e di conseguenza sulle superfici dell'organo, possa provocare uno spiccato aumento dello stress ossidativo e dell'infiammazione con conseguente disturbo dello sviluppo corticale cerebellare ⁹⁶⁻⁹⁸.

4.3 Neuroimaging

L'ecografia cerebrale, che rappresenta il primo esame che viene effettuato nel neonato pretermine, è specifica e sensibile sufficientemente per reperire lesioni di grandi e medie dimensioni. Per una buona visualizzazione delle strutture sottotensoriali si utilizzano le finestre acustiche delle fontanelle posterolaterale e mastoidea, che offrono un'angolazione favorevole e una migliore vicinanza di tali strutture rispetto alla fontanella anteriore⁹⁹⁻¹⁰¹.

Il gold standard per la diagnosi è però rappresentato dalla RM cerebrale, in grado di rilevare lesioni millimetriche, non altrimenti discriminabili con l'ecografia, e di definirne estensione e localizzazione precise (figura 13)¹⁰²⁻¹⁰³.

Figura 13. Microemorragie cerebellari (freccette) identificate grazie alla risonanza magnetica con sequenze di susceptibility-weighted imaging in un neonato di 26 settimane gestazionali all'età corretta del termine (A). Non visibili le stesse lesioni all'ecografia cerebrale attraverso la fontanella anteriore (A) e mastoidea (B e C). Immagini tratte da Parodi et al.⁸⁸



4.4 Outcome neuroevolutivo

Nonostante siano aumentate le diagnosi di emorragia cerebellare neonatale nel corso degli ultimi anni, il loro impatto sulla prognosi a lungo termine è ancora in gran parte sconosciuto. Culturalmente il cervelletto è noto per rivestire un ruolo centrale nell'equilibrio e nella sfera motoria, nello specifico la coordinazione durante il movimento. Tuttavia, numerose sono le evidenze che la sua funzione non si limiti a questi domini, ma si estenda anche ai campi dell'apprendimento, del linguaggio, della personalità e della sfera cognitiva¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

Ampie lesioni atrofico-emorragiche del cervelletto, bilaterali, invariabilmente associate a ipoplasia del ponte e a lesioni sovratentoriali si associano di frequente a microcefalia e deficit neurologici, inclusi quadriplegia spastica, distonia, atassia, epilessia e ritardo mentale¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Inoltre, lesioni più o meno estese, ma limitate al cervelletto in assenza di coinvolgimento sovratentoriale si associa prevalentemente a disabilità cognitiva, disturbi di personalità e deficit delle capacità comunicative¹¹⁰. In particolare, i disturbi della sfera cognitiva e del comportamento sono evidenti in caso di lesioni isolate degli emisferi cerebellari, mentre è emersa una significativa associazione tra alterazioni del comportamento sociale e disturbi dello spettro autistico con le lesioni a livello del verme¹¹⁰.

L'evidenza delle ripercussioni dell'emorragia cerebellare su aree non motorie, specie quella cognitiva, è stata ulteriormente confermata dal riscontro di una significativa associazione tra la diminuzione del volume degli emisferi cerebellari in bambini ex pretermine e un declino delle funzioni cognitive, ma non di quelle motorie^{111,112}.

Se la prognosi di lesioni estese e altamente destruenti l'architettura cerebellare è stata a lungo studiata, sono ad oggi esigui gli studi che hanno studiato l'outcome

neurologico delle emorragie cerebellari microscopiche e non associate ad altri esiti cerebrali, diagnosticate solo a mezzo della risonanza magnetica cerebrale. I pochi studi presenti suggeriscono che le lesioni cerebellari minime possano avere un ruolo nella regolazione del tono muscolare e dei riflessi, e che la patologia cerebellare possa amplificare i deficit primitivamente causati da altre lesioni cerebrali quali GMH-IVH e lesioni della sostanza bianca; al contrario, minime emorragie cerebellari con sembrano associate a significative alterazioni del neurosviluppo ¹¹³. Sono comunque necessari studi a lungo termine per poter indagare meglio il possibile contributo sulla sfera comportamentale, difficilmente valutabile nei primi 2 anni di vita.

5. LESIONI DELLA SOSTANZA BIANCA CEREBRALE

Tra le lesioni cerebrali associate alla prematurità, le lesioni della sostanza bianca sono le più frequenti nei neonati con peso alla nascita inferiore a 1500 g. Esse sono caratterizzate dalla compromissione dell'integrità strutturale della sostanza bianca cerebrale, che si configura come perdita di pre-oligodendrociti e fibre nervose in fase di mielinizzazione ¹¹⁴.

Lo spettro di tali lesioni comprende due principali forme patologiche:

- la leucomalacia periventricolare (PVL);
- lesioni puntate della sostanza bianca periventricolare (PWML).

5.1 Patogenesi e fattori di rischio

La maggior parte dei neonati pretermine che sviluppa lesioni della sostanza bianca presenta un'età gestazionale compresa tra 27 e 32 settimane ¹¹⁵. La vulnerabilità dell'encefalo in tale periodo è dipendente dallo stadio di sviluppo della sostanza bianca.

In epoca fetale, dopo la chiusura del tubo neurale, inizia un'intensa proliferazione e migrazione neuronale a cui fa seguito la proliferazione dei precursori delle cellule gliali. Nell'ultimo trimestre di gravidanza prevale invece lo sviluppo delle connessioni sinaptiche interneuronali, che esita in una progressiva arborizzazione di dendriti e assoni con mielinizzazione delle fibre nervose ¹¹⁶.

La matrice germinativa, sede di intensa attività mitotica finalizzata alla produzione di neuroni e cellule gliali, raggiunge il suo massimo sviluppo intorno alla 25° settimana di età gestazionale, superata la quale inizia gradualmente a ridursi, scomparendo verso la 36°-37° settimana. Quando la divisione cellulare è terminata e la maggior parte dei neuroni ha completato la sua migrazione, lo spessore della matrice germinativa decresce progressivamente, riducendo considerevolmente il suo spessore (da 2.5 mm a 23-24 settimane a 1.4 mm a 32 settimane). Il processo di involuzione della matrice germinativa inizia dai corni posteriori dei ventricoli laterali e procede poi in senso craniale terminando, alla fine della gestazione, intorno ai corni anteriori ^{117,118}.

La mielinizzazione è un processo di maturazione delle fibre nervose che esita nella copertura di queste con la guaina mielinica prodotta dagli oligodendrociti. Questo fenomeno è abbastanza precoce nelle strutture centrali dell'encefalo, come i talami e il tronco encefalico, mentre è più tardivo nel braccio posteriore della capsula interna dove non avviene fino al termine della gravidanza. Nelle fasi tardive della maturazione cerebrale, la vulnerabilità cerebrale all'insulto si correla quindi prevalentemente con i processi di mielinizzazione e di maturazione della sostanza bianca, in particolare in sede periventricolare.

Insulti infettivi, ischemici e infiammatori che intervengono durante le fasi più avanzate dello sviluppo cerebrale possono determinare una compromissione della maturazione della sostanza bianca tramite l'attivazione della microglia, la liberazione di citochine e glutammato e la produzione di radicali liberi ¹¹⁹⁻¹²². I fattori di rischio specifici per il danno della sostanza bianca non sono stati ancora del tutto chiariti, ma si ipotizza che esso abbia un'origine multifattoriale, nel quale l'infiammazione gioca un ruolo cruciale ¹²³.

5.2 Leucomalacia periventricolare

Tra le lesioni della sostanza bianca, la leucomalacia periventricolare rappresenta la forma più severa ed è caratterizzata da necrosi coagulativa con degenerazione di tutte le linee cellulari, inclusi glia e assoni. Questa condizione fu definita per la prima volta da Banker e Larroche nel 1962 ¹²⁴ e, più recentemente, da altri autori che la descrivono come un coinvolgimento simmetrico della sostanza bianca anteriore ai corni frontali dei ventricoli laterali, esternamente lungo i ventricoli laterali fino ai corni occipitali fino alla radiazione ottica ¹²⁵. Le cisti sono tipicamente maggiori di 2 mm, multiple, bilaterali, tendenzialmente simmetriche e coinvolgono uno o più lobi (figura 14) ¹²⁶.

L'incidenza della leucomalacia periventricolare si è marcatamente ridotta negli ultimi anni grazie al miglioramento delle cure neonatali, e attualmente se ne stima una prevalenza inferiore al 5% dei casi nei neonati pretermine sotto le 32 settimane ¹²⁷⁻¹³⁰.

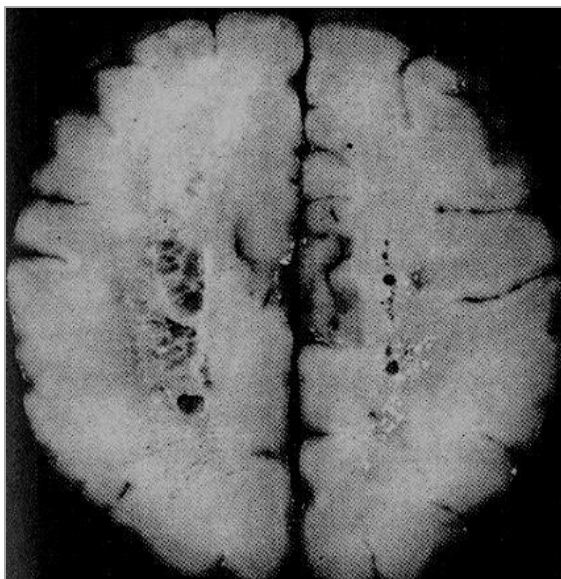
Il quadro istologico è caratterizzato da necrosi coagulativa, rigonfiamento degli assoni e proliferazione gliale.

Si distinguono due forme di manifestazione della leucomalacia periventricolare ¹³¹:

- cistica;
- non cistica o diffusa.

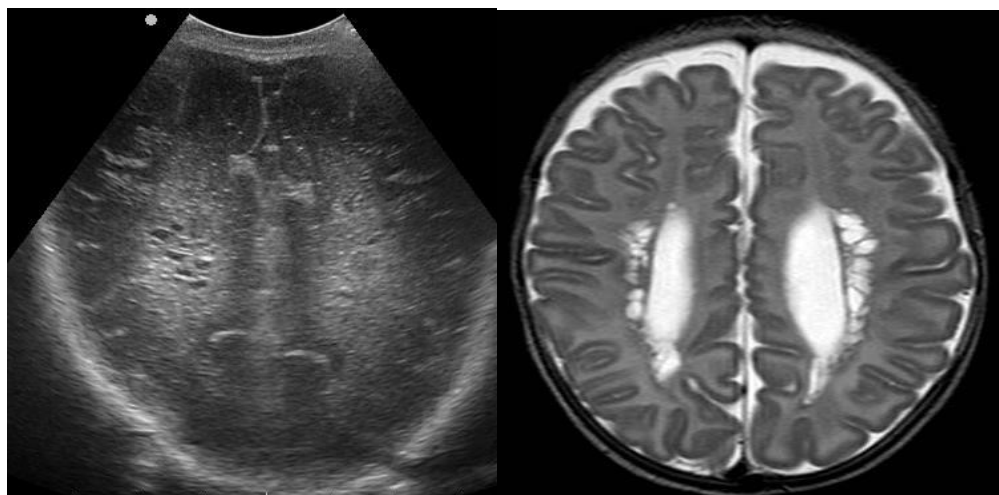
La leucomalacia periventricolare cistica (c-PVL) si caratterizza per la necrosi focale della sostanza bianca, spesso localizzata profondamente nel tessuto periventricolare (figura 14). La diagnosi di c-PVL avviene in primo luogo tramite l'ecografia transfontanellare, che evidenzia aree anecogene con aspetto cavitario (figura 15) ¹³². Progressivamente tali cavità variano di numero, aspetto e dimensione; possono arrivare a fondersi tra loro e generare cavità uniche più grandi oppure scomparire.

Figura 14. Aspetto autoptico delle cavitazioni necrotiche della leucomalacia periventricolare cistica.



La forma non cistica di PVL invece è caratterizzata da un processo patologico più diffuso, che si manifesta con assottigliamento della sostanza bianca e ampliamento dei ventricoli laterali. In questo caso la necrosi è microscopica e colpisce selettivamente gli oligodendrociti maturi e i loro precursori. L'indagine ultrasonografica offre scarso contributo alla diagnosi di questa forma di PVL, che può essere apprezzata unicamente come disomogenea ecogenicità ¹³³ o riduzione del volume cerebrale all'età corretta del termine ¹³⁴.

Figura 15. Immagine ecografica di c-PVL. Si notino le aree anecogene corrispondenti alle cavitazioni. In sequenza T2 pesata alla RM.



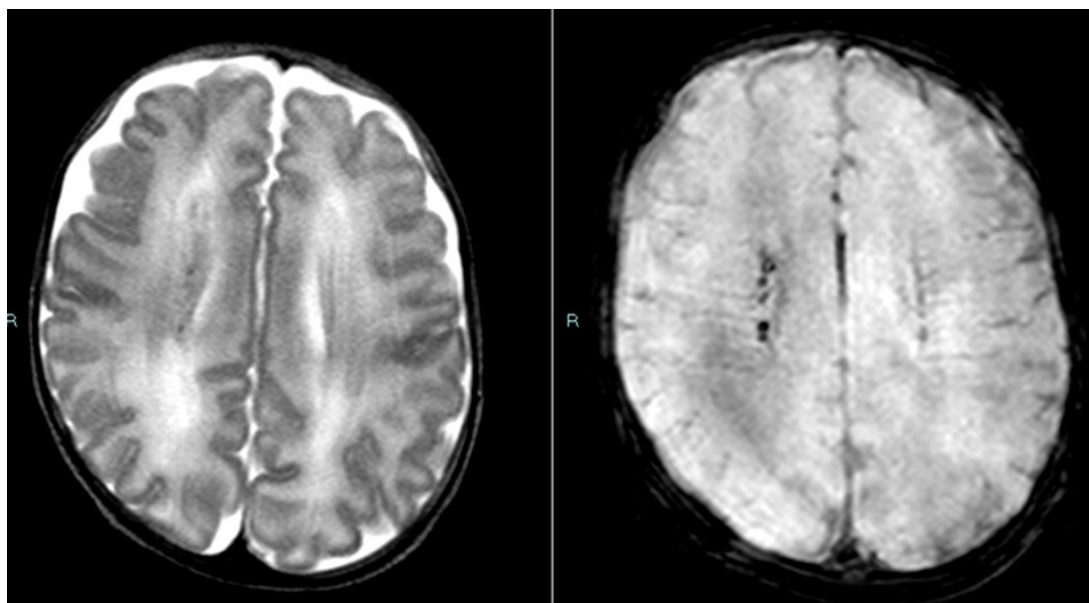
Il gold standard per lo studio della sostanza bianca e delle sue possibili alterazioni resta comunque la RM cerebrale che offre anche la possibilità di quantificare il danno neurologico secondario ¹³⁵. All'immagine RM si rileva tipicamente ventricolomegalia, irregolarità dei trigoni, perdita di sostanza bianca periventricolare e slargamento delle scissure. Inoltre, si può evidenziare un assottigliamento del corpo calloso, atrofia dei talami ed anomalie di segnale a carico del braccio posteriore della capsula interna, che riflettono una perdita di cellule neuronali ed un danno assonale ¹³⁶.

Dal punto di vista prognostico, è difficile prevedere la significatività clinica delle lesioni, soprattutto a lungo termine. La prognosi dei pazienti affetti da PVL dipende in gran parte dal sito e dall'estensione della malattia ¹³⁷. Le principali conseguenze funzionali di tali lesioni riguardano diversi domini neuroevolutivi tra cui il sistema motorio (paralisi cerebrale), la sfera cognitiva e del comportamento, la visione e l'udito. Inoltre, in caso di danno esteso, l'insorgenza di sindromi epilettiche è relativamente comune ¹³⁸.

5.3 Lesioni puntate della sostanza bianca

Le lesioni puntate della sostanza bianca periventricolare (PWMLs) sono un'entità nosologica di recente inquadramento, definibili come una forma di danno della sostanza bianca più comune, ma significativamente molto meno distruttiva della PVL. Nonostante ciò, possono comunque essere causa di una significativa compromissione del neurosviluppo. La loro definizione è basata sull'aspetto radiologico alla RM cerebrale. Tali lesioni consistono in piccole aree iperintense in sequenze T1 pesate e ipointense in sequenze T2 pesate, localizzate nella sostanza bianca periventricolare (figura 16) ¹³⁹.

Figura 16. Lesioni puntate della sostanza bianca nelle scansioni T2 e SWI, si presentano come aree puntiformi di riduzione del segnale.



L'incidenza di tali lesioni può raggiungere il 25% nei neonati pretermine VLBW. Le PWMLs sembrano manifestarsi prevalentemente nei neonati tra le 28 e 32 settimane di gestazione, periodo sovrapponibile a quello di maggior vulnerabilità per leucomalacia periventricolare ¹⁴⁰.

In un significativo numero di neonati le PWMLs sembrano essere causate da alterazioni del flusso ematico cerebrale, che riflettono l'imaturità anatomica e fisiologica del sistema vascolare. La sostanza bianca cerebrale ischemizzata è suscettibile al danno ossidativo che interviene in corso di rivascolarizzazione, mediato dai radicali liberi che colpiscono in particolare gli stadi immaturi dell'oligodendrocita.

La formazione delle PWML sembra essere dovuto sia alla comparsa che alla distribuzione regionale dei progenitori oligodendrociti che non maturano, e che rimangono in una fase “pre-mielinizzante”. La lesione dei progenitori oligodendrociti contribuirebbe alla patogenesi delle PWML poiché essa interrompe la maturazione degli oligodendrociti più maturi necessari per lo sviluppo della mielina. Tra i mediatori chimici che possono partecipare alla lesione della sostanza bianca ci sono le specie reattive dell'ossigeno, il glutammato, le citochine e l'adenosina.

Dai pochi studi postmortem disponibili è emerso che tali lesioni consistono in clusters di microglia attivata e foci di congestione vascolare, suggerendo una patogenesi sia su base ipossico ischemica, sia emorragica ¹⁴¹.

Lo studio di Miller del 2003 ha ricercato l'associazione tra PWML rilevate ad un'indagine di RM effettuata precocemente e fattori di rischio clinici, senza trovare nessuna correlazione significativa ¹⁴². Allo stesso modo Leijser non ha individuato fattori di rischio clinici direttamente correlati alle PWML rilevate alla RM eseguita all'età corretta del termine ^{25,143}. Altri studi invece hanno identificato come possibile fattore di rischio l'insorgenza di infezioni postnatali. Al contrario, gli studi di Wagenar e Tusor del 2017 hanno individuato come fattori strettamente correlati all'insorgenza di PWML un peso alla nascita più alto e la presenza di IVH di II e III grado ¹⁴⁴.

Riguardo alla loro distribuzione, è stata proposta recentemente una classificazione che le distingue in ¹³⁵:

- Anteriori: anteriormente al corno frontale dei ventricoli laterali;
- Mediali: lateralmente ai ventricoli laterali, nella corona radiata;
- Posteriori: posteriormente al corno occipitale dei ventricoli laterali.

Sono stati identificati inoltre i seguenti pattern di distribuzione delle lesioni ¹⁴⁵:

1. *PWML a pattern lineare*: organizzate lungo una linea, in stretta correlazione le une con le altre, è la più frequente distribuzione di tali lesioni nel pretermine. Si localizza quasi sempre nella sostanza bianca periventricolare anteriore o laterale, adiacente alle vene midollari. Si ritiene possano essere causate dall'accumulo di prodotti di degradazione dell'emoglobina in seguito ad anche minimi sanguinamenti, che scatenano la produzione di radicali liberi e provocando la necrosi degli oligodendrociti. L'aspetto ipointenso alla SWI della maggior parte delle lesioni distribuite in modo lineare sembra confermare la loro origine emorragica.

2. *PWML in cluster*: organizzate in gruppi, a formare un'area rotondeggiante. Si apprezzano meglio nelle sequenze T1 pesate, come zone di aumentata intensità di segnale. Sembrano essere costituite da aree di gliosi precoce a probabile eziologia infiammatoria. Si trovano principalmente la sostanza bianca periventricolare anteriore e laterale, e si ipotizza rappresentino lesioni della sostanza bianca non emorragiche, quali risultato di cicatrici gliali precoci ^{146,147}.

3. *PWML a disposizione intermedia*: pattern meno frequente in cui le lesioni sono distribuite sia nella sostanza bianca periventricolare anteriore e laterale sia, con minor frequenza, nella sostanza bianca periventricolare posteriore.

L'esecuzione della RM cerebrale a poche settimane dalla nascita e la sua ripetizione all'età corretta del termine ha evidenziato come tali lesioni vadano incontro ad un evoluzione: molte di esse rimangono stabili, altre tendono a regredire, altre ancora, seppur più raramente, compaiono come nuove ^{148,149}.

Quanto le PWML, in assenza di altre lesioni visualizzabili in RM, incidano sullo sviluppo neuromotorio rimane ancora da chiarire. La gravità dell'insulto a carico della sostanza bianca varia a seconda del numero e dell'estensione delle lesioni. Il quadro è definito moderato se sono presenti più di tre lesioni o lesioni di dimensioni superiori a 2 mm, ma che coinvolgano meno del 5% dell'emisfero cerebrale. Si considera severa invece l'estensione delle lesioni oltre il 5% dell'emisfero. Dopo l'età corretta del termine il cut off di severità è stabilito dalla presenza di almeno sei lesioni puntate. A queste lesioni spesso si associano modificazioni del volume cerebrale e ampliamento dei ventricoli.

Le PWML su RM eseguita all'età equivalente a termine senza altre lesioni focali o lesioni della sostanza grigia sono state associate ad un outcome motorio negativo a 20 mesi.

6. LA PLACENTA

La placenta è un organo altamente specializzato che insieme alle membrane fetali e al liquido amniotico supporta lo sviluppo fetale. Essa garantisce la respirazione e la nutrizione del feto, e presenta un'importante attività endocrina che ne favorisce lo sviluppo nelle diverse fasi della gravidanza. Inoltre, funge da barriera fisica e chimica nei confronti di numerosi agenti infettivi che per via ematica o ascendente potrebbero raggiungere l'ambiente fetale. A termine, la placenta umana è un organo di forma discoidale con un diametro di circa 20 cm uno spessore centrale di circa 2.5 cm e un peso medio di circa 500 g ¹⁵⁰. La placenta umana è un organo emocoriale: il sangue fetale e quello materno sono separati da un tessuto composto da tre strati, tutti di origine fetale, quali l'endotelio dei capillari fetali, il connettivo stromale del villo e l'epitelio coriale del villo, quest'ultimo direttamente bagnato dal sangue materno ¹⁵¹.

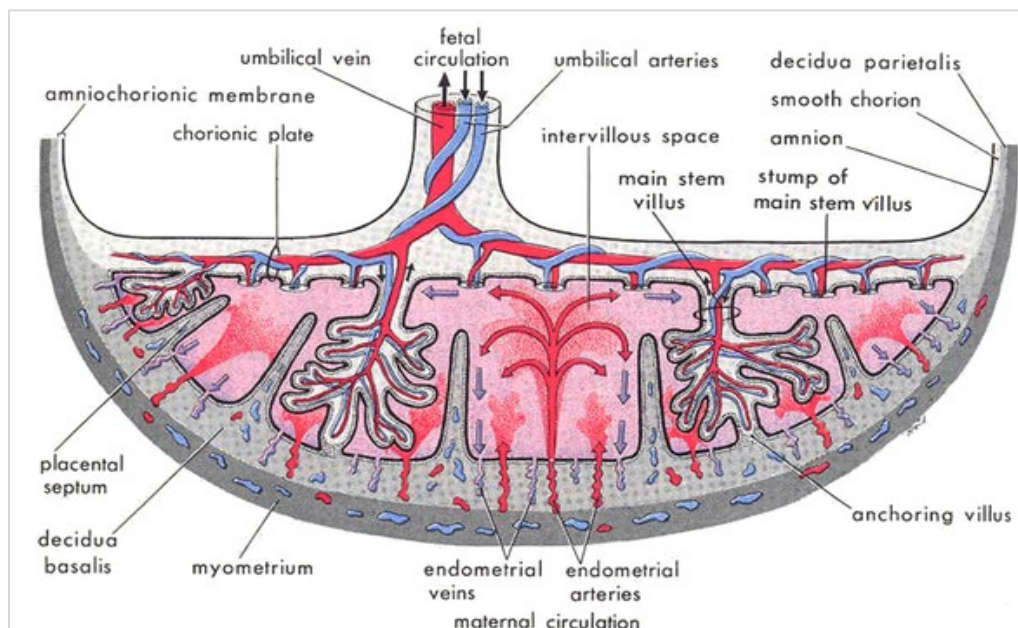
L'unità utero-placentare è composta sia dai tessuti fetali derivanti dal sacco corionico sia da tessuti materni derivanti dall'endometrio. Nella placenta matura, il piatto corionico rappresenta il versante fetale, che contiene i vasi sanguigni fetali che originano dai vasi ombelicali. Il piatto basale rappresenta invece il versante materno. Tra queste due regioni si trova lo spazio intervilloso, che contiene le principali unità funzionali della placenta (figura 17). La cosiddetta barriera placentare, spessa 5-6 micron ed estesa circa 14-15 cm², è appunto l'insieme dei tessuti che separa la circolazione materna e fetale e che regola tutti gli scambi nutritizi tra feto e madre ¹⁵². La faccia fetale della placenta appare liscia e traslucida, rivestita dalle membrane amniocoriali e presenta l'inserzione

del funicolo ombelicale. La faccia materna è spugnosa, scura e ondulata. Appare suddivisa grossolanamente in 16-20 settori, che prendono il nome di cotiledoni materni.

Sezionando la placenta, si possono distinguere, a partire dal piatto basale, i seguenti strati:

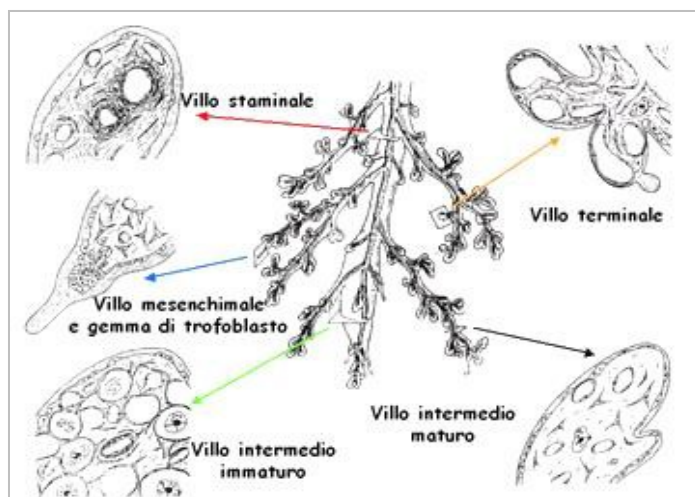
- decidua basale, composta di uno strato spongioso, uno strato compatto e uno strato fibrinoide;
- strato dei villi coriali;
- piatto corionico;

Figura 17. Anatomia macroscopica della placenta: la decidua basale origina dall'endometrio e da questa le arterie spirali aggettano nello spazio intervilloso. I setti intervilliosi si approfondano nello spazio intervilloso definendo i cotiledoni materni. I villi sono raggruppati tra i setti intervilliosi e tramite la rete capillare in essi contenuta permettono gli scambi di ossigeno e di nutrienti tra sangue fetale e materno. La rete capillare villare si unisce a livello del piatto corionico, andando a costituire le arterie e la vena ombelicale. Ai margini placentari, amnios e corion formano il sacco amniotico, delineando la cavità amniotica¹⁵³



I villi primari compaiono durante la seconda settimana di gestazione come protuberanze del citotrofoblasto rivestite da uno strato esterno di sinciziotrofoblasto; successivamente si costituisce uno strato di tessuto connettivo dovuto alla migrazione e proliferazione di cellule mesenchimali provenienti dal mesoderma del corion (villi secondari). Con il progredire della gravidanza, all'interno dei villi secondari si forma una rete capillare (villi terziari). Un insieme di ramificazioni villose di un unico villo di I ordine forma il cotiledone fetale (nella placenta a termine se ne contano circa duecento) (figura 18). I setti placentari intervilliosi sono lamine di decidua compatta che si insinuano tra i villi e che unendosi tra di loro formano i cotiledoni materni, che comprendono i diversi cotiledoni fetali (circa 16-20).

Figura 18. Struttura del cotiledone fetale



Il sangue materno circola nello spazio intervilloso attraverso le arterie spirali endometriali, bagna i villi e viene poi drenato attraverso le vene endometriali. Attraverso le arterie ombelicali e successivamente le arterie corioniche, il sangue fetale raggiunge il sistema capillare dei villi corionici. Una volta riossigenato, il sangue fetale raggiunge il feto attraverso le vene corioniche e la vena ombelicale.

Per unificare la descrizione delle caratteristiche istopatologiche della placenta, nel 2014 è stata proposta la classificazione di Amsterdam (figura 19) che esamina in maniera dettagliata i diversi aspetti di anatomia microscopica per avvicinare tale esame alla comprensione fisiopatologica della patologia perinatale.

Figura 19. Criteri di classificazione delle lesioni placentari secondo l'Amsterdam Placental Workshop Group, da Khog et al¹⁵⁴

Placental classification (incorporating the 2014 Amsterdam Placental Workshop Group criteria)	
1. Placental vascular processes	
a. Maternal stromal-vascular lesions	
Developmental	
Superficial implantation/decidual arteriopathy	
Increased immature extravillous trophoblast	
Malperfusion	
Global/partial	
Early: distal villous hypoplasia	
Late: accelerated villous maturation	
Segmental/complete	
Villous infarct(s)	
Loss of integrity	
Abruptio placenta (arterial)	
Marginal abruption (venous)	
Acute	
Chronic	
b. Fetal stromal-vascular lesions	
Developmental	
Villous capillary lesions	
Delayed villous maturation (maturation defect)	
Dysmorphic villi	
Malperfusion	
Global/partial	
Obstructive lesions of umbilical cord	
Recent intramural fibrin in large fetoplacental vessels	
Small foci of avascular or karyorhectic villi	
Segmental/complete	
Chorionic plate or stem villous thrombi	
Large foci of avascular or karyorhectic villi	
Loss of integrity	
Large vessel rupture (fetal hemorrhage)	
Small vessel rupture (fetomaternal hemorrhage)	
Villous edema	
2. Placental inflammatory-immune processes	
a. Infectious inflammatory lesions	
Acute	
Maternal inflammatory response: chorioamnionitis, subchorionitis	
Fetal inflammatory response: chorionic/umbilical vasculitis	
Chronic	
Villitis (CMV, others)	
Intervillositis (malaria, others)	
b. Immune/idiopathic inflammatory lesions	
Villitis of unknown etiology and related/associated lesions	
Chronic villitis	
Chronic chorioamnionitis	
Lymphoplasmacytic deciduitis	
Eosinophil T-cell fetal vasculitis	
Chronic histiocytic intervillositis	
3. Other placental processes	
Massive perivillous fibrin(oid) deposition (maternal floor infarction)	
Abnormal placental shape or umbilical insertion site	
Morbidly adherent placentas (accreta)	
Meconium-associated changes	
Increased circulating nucleated red blood cells	

6.1 Lesioni placentari e cerebrali nei nati pretermine

La precisa conoscenza anatomica dell'organizzazione strutturale dell'albero villare mediante la definizione della tipologia dei vari segmenti e delle loro caratteristiche maturative, ha permesso di comprendere i meccanismi di crescita e sviluppo dei cotiledoni e quindi del disco coriale ¹⁵⁴. Per tali ragioni, diagnosi generiche e descrittive sono ora sempre più frequentemente sostituite da ragionamenti anatomo-clinici basati sulle evidenze morfologiche, normali o patologiche, e sulla fisiopatologia, basata a sua volta su evidenze morfofunzionali. Concetti di crescita, maturazione e funzione hanno dato allora senso alle osservazioni che per molti anni, pur nell'esattezza della descrizione istopatologica, costituivano un insieme di elementi slegati e ripetitivi. È stata così sradicata l'idea che le placente, ritenute da molti organi di appartenenza materna, fossero tutte uguali, con lesioni aspecifiche anche a fronte di patologie materne differenti, incapaci di patologia propria e tanto meno capaci di condividere ed esprimere patologie fetali.

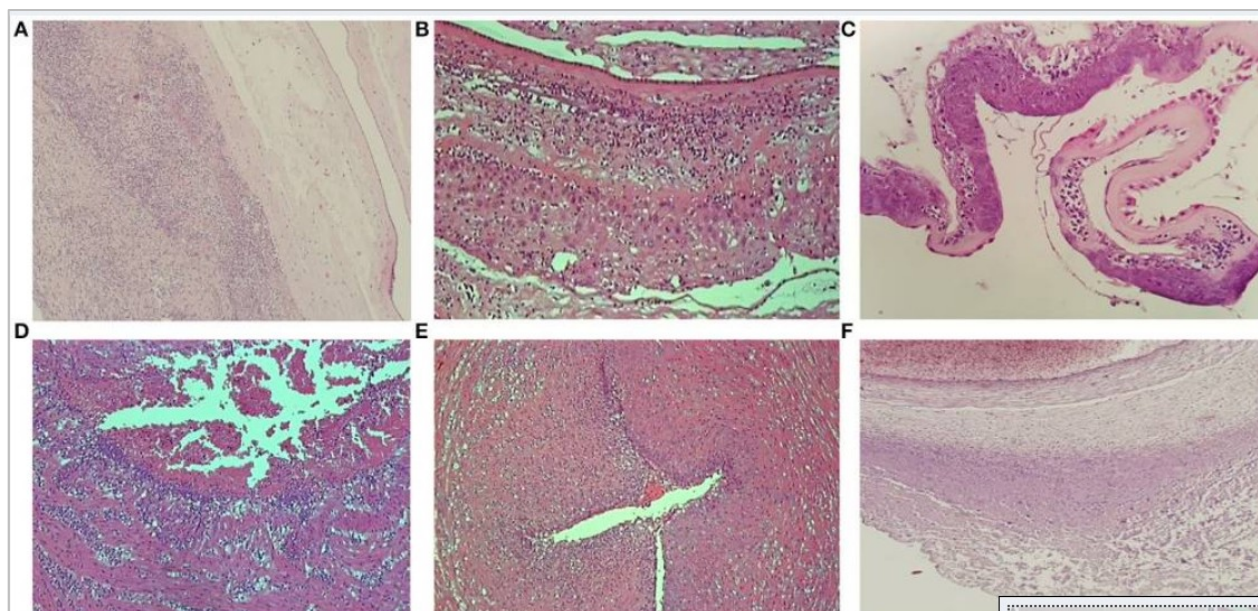
Progressivamente si è fatta strada l'idea che la placenta fosse parte del feto, che quest'ultimo potesse avere patologia propria e, di conseguenza, che potesse avere patologia propria anche la placenta.

Tra le patologie placentari, l'infezione/infiammazione degli annessi fetali (corioamnionite/funisite) rappresenta la causa primitiva di parto pretermine in una percentuale significativa di casi che raggiunge il 50% ¹⁵⁵. Negli ultimi decenni sono stati condotti diversi studi per cercare di comprendere se e in quale misura uno stato infettivo/infiammatorio intrauterino possa peggiorare l'outcome a breve e a lungo termine dei neonati prematuri ¹⁵⁶. I risultati ottenuti in diversi studi sono però discordanti e ciò può essere in gran parte attribuibile alla concomitante presenza di molti fattori confondenti,

quali l'età gestazionale, i diversi criteri diagnostici utilizzati e i differenti e spesso multipli insulti postnatali a cui un neonato prematuro va incontro.

L'infezione intrauterina si può verificare nella decidua materna, tra i tessuti materni e le membrane fetali, cioè nello spazio corio-deciduale, negli annessi fetali propriamente detti, cioè nelle membrane fetali (corion e amnion), nella placenta, nel liquido amniotico, nel cordone o funicolo ombelicale, fino ad arrivare a interessare anche il feto (figura 19)¹⁵⁷.

Figura 19. Sezioni placentari che mostrano i tre gradi di risposta infiammatoria materna e fetale; A: risposta infiammatoria materna – stadio 1; B: risposta infiammatoria materna – stadio 2; C: risposta infiammatoria materna – stadio 3; D: risposta infiammatoria fetale – stadio 1; E: risposta infiammatoria fetale – stadio 2; F: risposta infiammatoria fetale – stadio 3. Da Parodi et al.¹⁵⁸



I meccanismi attraverso i quali l'infezione intrauterina porta al travaglio pretermine sono la conseguenza dell'attivazione del sistema immunitario innato materno. La componente innata del sistema immunitario assicura una protezione immediata dall'invasione microbica, riconoscendo la presenza dei microorganismi o dei loro prodotti,

prevenendo l'invasione tissutale ed evocando nell'ospite una risposta mirata a limitare la proliferazione microbica. Si innesca una cascata di eventi che porta al rilascio di numerosi mediatori dell'infiammazione, tra cui citochine, chemochine, prostaglandine, proteasi e altri enzimi. In particolare, le prostaglandine stimolano la contrattilità uterina, mentre gli enzimi degradanti la matrice extracellulare favoriscono la rottura delle membrane.

Il risultato finale di questa cascata infiammatoria è l'induzione della contrattilità uterina, l'infiltrazione di cellule infiammatorie nei tessuti gestazionali, il distacco della placenta e una serie di cambiamenti biochimici e strutturali a livello della cervice uterina, definiti *ripening* (ammorbidimento, appianamento) e *weakening* (indebolimento) delle membrane fetali ¹⁵⁹. Anche il feto può giocare un ruolo importante nell'induzione del travaglio pretermine in risposta ad un insulto infettivo. Quando l'infezione raggiunge il feto, l'aumentata produzione fetale di ormone corticotropo determina una aumentata produzione di cortisolo fetale e quindi di prostaglandine. Inoltre, aumenta la produzione fetale di citochine, il cui livello nel sangue fetale è stato dimostrato correlare in modo significativo con l'insorgenza di parto pretermine. Quando l'insulto infettivo o infiammatorio, a partenza dalla madre, raggiunge il feto, questo può innescare una sua risposta infiammatoria, la cui intensità è direttamente proporzionale alla maturità del suo sistema immunitario. Si configura così il quadro della cosiddetta FIRS (Fetal Inflammatory Response Syndrome), descritto per la prima volta nel 1998 sulla base di concentrazioni elevate di interleuchina (IL)-6 nel sangue fetale (>11 pg/mL), e caratterizzata dal punto di vista istopatologico da un quadro di funisite/vasculite corionica, con presenza di granulociti polimorfonucleati fetali nei vasi del funicolo ¹⁶⁰⁻¹⁶².

La correlazione tra corioamnionite e danno cerebrale neonatale è stata valutata in numerosi studi, analizzati in una recente revisione pubblicata nel 2012 da Ylijoki et al., in

cui è emerso che la corioamnionite clinica risultava essere un fattore di rischio per lesioni cerebrali nel neonato pretermine, diagnosticate con ecografia transfontanellare, nel 65% degli studi ¹⁶³. Dopo analisi multivariata con correzione per l'età gestazionale, la corioamnionite clinica rimaneva un fattore di rischio indipendente per lesioni cerebrali in neonati prematuri solo nel 23% degli studi. La corioamnionite istologica, invece, si associava a lesioni cerebrali nel 70% degli studi, rimanendo significativa dopo correzione per età gestazionale nel 35% di essi. A conclusione della metanalisi, gli autori consideravano che la maggior parte degli articoli valutati non supportava l'ipotesi che la corioamnionite fosse un fattore di rischio indipendente per un alterato sviluppo del sistema nervoso centrale, anche se le evidenze disponibili rimanevano contrastanti.

Per quanto riguarda la correlazione con le lesioni della sostanza bianca, sebbene diversi studi abbiano stabilito che sia la corioamnionite clinica sia quella istologica sono significativamente associate alla c-PVL e alla paralisi cerebrale infantile, altri lavori non hanno dimostrato la presenza di questa associazione ^{164,165}. La presenza di risultati così contrastanti può essere in gran parte attribuibile alla concomitante presenza di molte variabili confondenti, dalla diversa età gestazionale, ai diversi criteri diagnostici adottati per la definizione di corioamnionite e di lesioni cerebrali.

In particolare, tra i precedenti studi analizzati, i criteri diagnostici che appaiono differenti sono quelli che definiscono il quadro di corioamnionite, in cui la diagnosi spesso è basata solo sui dati clinici (tra cui tachicardia fetale, tachicardia materna, febbre materna, rialzo di PCR materna e leucocitosi materna), dimostrandosi un metodo diagnostico carente in oggettività e specificità; in secondo luogo, appaiono eterogenei i criteri diagnostici utilizzati per l'identificazione delle diverse tipologie di lesione cerebrale potenzialmente associate. Inoltre, la maggior parte degli studi di correlazione tra corioamnionite e lesioni

cerebrali del pretermine considera le lesioni emorragiche (principalmente GMH-IVH) e le lesioni della sostanza bianca in un'unica categoria, risultando poco focalizzati sulla correlazione tra l'alterazione infiammatoria placentare e la singola patologia cerebrale, peraltro la maggior parte di essi si concentra prevalentemente sulle lesioni della sostanza bianca e sulle paralisi cerebrali infantili, mentre la fisiopatologia delle emorragie intraventricolari e cerebellari, in questo ambito, non è stata altrettanto adeguatamente studiata.

È su tali premesse che sono state poste le basi per questo progetto di ricerca, articolato in diverse fasi e incentrato sullo studio delle lesioni placentari come fattore di rischio per le lesioni cerebrali nel pretermine.

7. FATTORI DI RISCHIO PRECOCI PER LESIONI EMORRAGICHE

Per valutare il ruolo delle lesioni istopatologiche placentari sul rischio di sviluppare le diverse lesioni cerebrali associate a prematurità, è stata analizzata una coorte di neonati con peso neonatale < 1500 g.

7.1 Metodi

È stata condotta un'analisi retrospettiva di una coorte di neonati pretermine con peso alla nascita inferiore a 1500 g, nati presso l'Ospedale Giannina Gaslini (Genova, Italia) tra gennaio 2012 e ottobre 2016. Sono stati inclusi tutti i neonati che avevano eseguito una RM cerebrale al termine di età corretta e per cui era stata eseguita alla nascita l'analisi istologica placentare. Sono stati esclusi invece tutti i neonati con sindromi genetiche, malformazioni congenite e malformazioni cerebrali.

Per quanto riguarda le lesioni cerebrali, sono state considerate le seguenti lesioni:

- GMH-IVH di qualsiasi grado
- CBH puntate (≤ 4 mm), limitate (> 4 mm ma occupanti meno di un terzo dell'emisfero cerebellare) e massive (occupanti più di un terzo dell'emisfero cerebellare)

I dati demografici e perinatali, tra cui i fattori di rischio noti per lesioni cerebrali associate alla prematurità sono stati raccolti dalle cartelle cliniche dei neonati inclusi. Le seguenti variabili prenatali sono state considerate: preeclampsia, gemellarità, restrizione di crescita

intrauterina, steroidi antenatali (due dosi), diabete gestazionale, tipo di parto (vaginale o taglio cesareo). Sono state inoltre considerate variabili perinatali, tra cui età gestazionale, sesso, peso alla nascita, Apgar a 1' e 5', somministrazione di surfattante, sepsi neonatale (early e late onset), enterocolite necrotizzante, pervietà del dotto di Botallo farmacologicamente o chirurgicamente trattato. I dati circa l'intubazione e la ventilazione meccanica, lo sviluppo di pneumotorace, e il trattamento con inotropi sono stati invece considerati se riportati entro le prime 72 ore di vita.

Per ogni paziente incluso, le immagini di RM cerebrale eseguite al termine di età corretta (tra 39+0 e 41+6 settimane di età corretta), effettuate come da protocollo interno per il follow-up del neonato pretermine, sono state raccolte e rivalutate. Le immagini sono state ottenute con un sistema a 1.5 Tesla (Intera Achieva; Philips, Best, The Netherlands) usando una bobina specifica per l'età pediatrica. L'esame è stato eseguito durante sonno spontaneo attraverso la tecnica del "feed and wrap", mentre la somministrazione di midazolam orale (0.1 mcg/kg) è stata usata per ottenere una leggera sedazione solo in casi selezionati, in considerazione dello stato comportamentale del neonato e della qualità delle immagini dopo la prima sequenza. Per ogni paziente è stata usata una protezione acustica, e la frequenza cardiaca e la saturazione arteriosa di ossigeno sono state monitorate mediante pulsiossimetro per tutta la durata dello studio. Le immagini di risonanza effettuate di routine sono state le seguenti: sequenze assiali e coronali T1 e T2 pesate (spessore = 3 mm), sequenza T1 pesata sagittale, immagini di diffusione assiali (b value: 1,000 s/mm²), e sequenze di Susceptibility weighted imaging (SWI). Prima dell'esecuzione della RM è stato ottenuto un consenso informato dai genitori, dopo aver loro spiegato significato e limitazioni dell'esame di RM al termine di età corretta.

Per valutare la presenza di GMH-IVH and CBH, tutte le immagini sono state revisionate da tre neuroradiologi esperti in RM neonatale, non informati circa la storia perinatale e l'analisi placentare dei neonati. Aree di perdita di segnale lungo le pareti dei ventricoli laterali o nel solco caudo-talamico alla SWI sono state interpretate come depositi di emosiderina subependimali o intraventricolari, compatibili con pregressa GMH-IVH. Analogamente, aree di perdita di segnale alla SWI nel contesto del parenchima cerebellare sono state interpretate come depositi di emosiderina, consistente con pregressa CBH.

Per quanto riguarda l'analisi placentare, l'esame macroscopico della placenta è stato ottenuto dal database elettronico del dipartimento di Anatomia Patologica, e sono state raccolte in merito le seguenti informazioni: gemellarità e corialità, inserzione velamentosa del cordone ombelicale, ematoma retroplacentare. Tre anatomopatologi specializzati nella valutazione della placenta hanno revisionato i vetrini e condotto una nuova analisi microscopica del parenchima placentare. Nello specifico sono state analizzate le seguenti sezioni fissate in formalina di 3–5 μm di spessore e colorate con ematossilina ed eosina: due o più sezioni di membrane extraplacentari, tre sezioni del cordone ombelicale e 12 sezioni di villi coriali, di cui uno adiacente all'inserzione del cordone ombelicale.

Le lesioni istologiche placentari sono state classificate secondo il Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement, e il grado di infiammazione placentare sul versante materno e fetale è stato rivalutato secondo la classificazione di Redline et al.¹⁶⁷, confermata dalla stessa Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement (tabella 7). Il grado della risposta infiammatoria materna e fetale non è invece stato incluso nell'analisi.

Tabella 7. Classificazione istologica della corioamnionite sul versante materno e fetale, da

Redline et al ¹⁶⁷

Risposta infiammatoria materna	
Stadio 1	Subcorionite acuta: accumulo diffuso di neutrofili nel piatto subcorionico e/o nello strato di trofoblasto corionico membranoso.
Stadio 2	Corionite acuta: presenza di neutrofili nel piatto corionico o nel tessuto connettivo del corion membranoso e/o nell'amnion.
Stadio 3	Corioamnionite necrotizzante: neutrofili, membrana basale amniotica con infiltrato eosinofilo e degenerazione per lo meno focale dell'epitelio amniotico.
Risposta infiammatoria fetale	
	Vasculite corionica/flebite vascolare: infiltrato neutrofilo nella parete dei vasi del piatto corionico o della vena ombelicale.
Stadio 2	Vasculite ombelicale: infiltrato neutrofilo in una o entrambe le arterie e nella vena.
Stadio 3	Funisite necrotizzante o vasculite periombelicale concentrica: neutrofili, frammenti cellulari, precipitato eosinofilo, e/o mineralizzazione a bande concentriche, anelli o aloni attorno ad uno o più vasi ombelicali.

La malperfusion vascolare materna è stata definita dalla presenza delle seguenti caratteristiche istologiche:

- maturazione accelerata dei villi;
- ipoplasia villare distale;
- infarti villari;
- arteriopatia deciduale.

La malperfusion fetale è stata indicata in presenza di:

- trombosi;
- villi avascolari segmentali;
- deposizione intramurale di fibrina;
- cariorecessi vascolari stromali.

È stata inoltre riportata la presenza di villite di eziologia non nota (foci multipli in più di una sezione, almeno una delle quali caratterizzata da infiammazione in più di 10 villi contigui) e la ritardata maturazione dei villi (popolazione di villi monotona con ridotto numero di membrane vasculo-sinciziali).

7.2 Analisi statistica

È stata effettuata una statistica descrittiva per l'intera coorte. I dati sono stati espressi come medie e deviazioni standard per le variabili continue. Sono stati inoltre calcolati i valori mediani, così come le frequenze assolute e relative per le variabili categoriche. Le caratteristiche cliniche e demografiche sono state confrontate usando il χ^2 o il test esatto di Fisher e il t test di Student per le variabili categoriche e continue, rispettivamente. È stata condotta un'analisi uni variata per determinare quali, tra le caratteristiche demografiche, perinatali e placentari erano significativamente più frequenti tra i pazienti con una lesione cerebrale specifica. Per ogni variabile è stata effettuata quindi un'analisi di regressione logistica e i risultati sono stati riportati come odds ratio (OR) con intervallo di confidenza la 95%. L'assenza di esposizione ai fattori o alle variabili meno probabilmente associati al rischio di lesioni è stata usata come riferimento per ciascuna Analisi. Successivamente è stata condotta un'analisi multivariata in cui solo le variabili significative o borderline all'analisi univariata ($P < 0.08$) sono state incluse nel modello. Nel modello finale un P-value inferiore a 0.05 è stato considerato statisticamente significativo e tutti i P-value sono stati basati su test a due code. L'analisi statistica è stata effettuata usando il programma Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) per Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

7.3 Risultati

Durante il periodo di studio sono stati identificati 348 neonati VLBW. Di questi, 26 (7,5%) pazienti sono deceduti prima di raggiungere il termine di età corretta e un paziente (0,3%) è stato escluso dallo studio a causa dell'assenza di MR cerebrale. L'esame patologico della placenta non è stato eseguito in 35 (10%) dei casi. I restanti 286 soggetti (82,2%) sono stati inclusi nello studio. Dei 286 pazienti nella popolazione finale dello studio, 135 erano maschi (47,2%). L'età gestazionale media era 28,2 settimane (deviazione standard, DS \pm 2,2 settimane) e il peso medio alla nascita era 1040 g (DS \pm 264 g).

I punteggi di Apgar mediani a 1' e 5' erano 6 (intervallo, 0–9) e 8 (intervallo, 0–10). La presenza di GMH-IVH di qualsiasi grado è stata rilevata in 68 pazienti (23,8%), mentre la presenza di CHB è stata identificata in 48 pazienti (16,8%). Nello specifico, 50/68 neonati (73,5%) con GMH-IVH diagnosticata alla MR avevano già ricevuto la diagnosi ecografica, e la maggior parte di essi (47/50, 94%) aveva ricevuto la diagnosi entro le prime 72 ore di vita. Inoltre, nel gruppo di pazienti esclusi a causa dell'assenza di esame placentare non abbiamo riscontrato differenze significative nell'incidenza di GMH-IVH (10/35, 28,6%) né di CBH (4/35, 11,4%) rispetto alla popolazione in studio ($p = 0,677$ e $0,626$, rispettivamente).

Fattori di rischio per GMH-IVH

I dati clinici demografici e perinatali sono mostrati nella Tabella 7. L'età gestazionale media ($27 \pm 2,2$ settimane vs $28,6 \pm 2,1$ settimane; $P = 0,001$) e il peso alla nascita (908 ± 250 g vs 1080 ± 255 g; $P = 0,001$) erano significativamente inferiori nei pazienti che hanno sviluppato GMH-IVH. Nell'analisi univariata, i neonati con GMH-IVH avevano meno probabilità di essere esposti a preeclampsia e di essere nati con taglio

cesareo ($P = 0,04$ e $P \leq 0,0001$, rispettivamente). I neonati con GMH-IVH avevano una frequenza significativamente più alta di avere le seguenti caratteristiche: Apgar a 5 minuti inferiore a 5, intubazione, ventilazione meccanica e terapia con inotropi entro le prime 72 ore, somministrazione di surfattante, sepsi ad esordio tardivo e dotto arterioso pervio (PDA) trattato (Tabella 8). Inoltre, la presenza contemporanea di CBH era significativamente più frequente in questa popolazione ($P = 0,0001$). I reperti placentari delle due popolazioni sono mostrati nella Tabella 1. Nell'intero spettro della corioamnionite istologica, nell'analisi univariata, la risposta infiammatoria materna grave (stadio 3) e la risposta infiammatoria fetale (stadio 2) sono risultate associate a GMH-IVH ($P = 0,007$ e $P = 0,04$, rispettivamente). Al contrario, la malperfusion vascolare materna è risultata più frequente nei bambini senza tale lesione ($P = 0,05$).

Come mostrato nella Tabella 9, i fattori di rischio per GMH-IVH identificati dall'analisi multivariata corretta per l'età gestazionale sono risultati essere i seguenti: presenza di CBH (OR, 8.14; 95% CI, 3.63-18.24), ventilazione meccanica entro le prime 72 ore (OR, 2.67; 95% CI, 1,23-5,79) e PDA trattato farmacologicamente (OR, 2,6; 95% CI, 1,16-5,83). Nella nostra coorte, sia le risposte infiammatorie materne lievi (stadio 1) che quelle gravi (stadio 3) sono risultate un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di GMH-IVH (OR, 2.92; 95% CI, 1.04-8.19 e OR, 4; 95 % CI, 1,24–12,9, rispettivamente). Il taglio cesareo è risultato essere un fattore protettivo (OR, 0,26; 95% CI, 0,11-0,58).

Tabella 8. Dati demografici, caratteristiche cliniche e reperti placentari dei neonati con e senza diagnosi di emorragia intraventricolare (GMH-IVH)

	Popolazione (N = 286)	GMH-IVH (N = 68)	no GMH-IVH (N = 218)	P value
	N (%)	N (%)	N (%)	
Dati prenatali				
Sesso maschile	135 (47.2)	36 (52.9)	99 (45.4)	0.33
Ritardo di crescita intrauterino	78 (27.3)	15 (22.1)	63 (28.9)	0.35
Profilassi steroidea antenatale	224 (78.6)	48 (70.6)	176 (80.7)	0.09
Diabete materno	11 (3.8)	2 (2.9)	9 (4.1)	1
Preeclampsia	64 (22.4)	9 (13.2)	55 (27.1)	0.04
Gravidanza gemellare	113 (39.5)	28 (41.2)	85 (39.0)	0.78
Trasfusione feto-fetale	22 (7.7)	5 (7.4)	17 (7.8)	1
Taglio cesareo	227 (79.4)	43 (63.2)	184 (84.4)	≤0.0001
Dati postnatali				
Età gestazionale media (SD), settimane	28.2 ± 2.2	27 ± 2.2	28.6 ± 2.1	0.001
Peso alla nascita media (SD), g	1040 ± 264	908 ± 250	1080 ± 255	0.001
1' Apgar ≤ 5	114 (39.9)	34 (50)	80 (36.7)	0.06
5' Apgar ≤ 5	11 (3.8)	7 (10.3)	4 (1.8)	0.005
Intubazione nelle prime 72 ore	205 (71.7)	61 (89.7)	144 (66.1)	<0.0001
Ventilazione meccanica nelle prime 72 ore	149 (52.1)	49 (72.1)	100 (45.9)	<0.0001
Surfattante	200 (69.9)	59 (86.8)	141 (64.7)	<0.0001
Pneumotorace nelle prime 72 ore	11 (3.8)	4 (5.9)	7 (3.2)	0.29
Inotropi nelle prime 72 ore	24 (8.4)	10 (14.7)	14 (6.4)	0.04
Sepsi precoce	10 (3.5)	3 (4.4)	7 (3.2)	0.71
Sepsi tardiva	131 (45.8)	39 (57.4)	92 (42.2)	0.03
>1 sepsi tardiva	44 (15.4)	17 (25)	27 (12.4)	0.02
Enterocolite necrotizzante (NEC)	17 (5.9)	5 (7.4)	12 (5.5)	0.56
Terapia chirurgica per NEC	10 (3.5)	4 (5.9)	6 (2.8)	0.25
PDA trattato	174 (60.8)	51 (75)	123 (56.4)	0.007
PDA trattato chirurgicamente	31 (10.8)	16 (23.5)	15 (6.9)	<0.0001
Emorragia cerebellare	48 (16.8)	30 (44.1)	18 (8.3)	0.0001
Istologia placentare				
Placenta gemellare monocorionica	38 (13.3)	7 (10.3)	31 (14.2)	0.54
Inserzione velamentosa del funicolo	27 (9.4)	5 (7.4)	22 (10.1)	0.64
Fetal inflammatory response – stadio 1	23 (8)	9 (13.2)	14 (6.4)	0.09
Fetal inflammatory response – stadio 2	9 (3.1)	5 (7.4)	4 (1.8)	0.04
Fetal inflammatory response – stadio 3	23 (8)	6 (8.8)	17 (7.8)	0.80
Maternal inflammatory response – stadio 1	29 (10.1)	11 (16.2)	18 (8.3)	0.06
Maternal inflammatory response – stadio 2	37 (12.9)	8 (11.8)	29 (13.3)	0.84
Maternal inflammatory response – stadio 3	22 (7.7)	11 (16.2)	11 (5)	0.007
Villite di origine sconosciuta	31 (10.8)	10 (14.7)	21 (9.6)	0.26
Malperfusion vascolare materna	165 (57.7)	32 (47.1)	133 (61)	0.05
Malperfusion vascolare fetale	11 (3.8)	3 (4.4)	8 (3.7)	0.73
Ritardata maturazione dei villi	44 (15.4)	8 (11.8)	36 (16.5)	0.26
Ematoma retroplacentare	52 (18.2)	12 (17.6)	40 (18.3)	1

Tabella 9. Regressione logistica dei potenziali fattori di rischio per emorragia intraventricolare (GMH-IVH)

	GMH (N = 68)	no GMH (N = 218)	OR (95% IC)	P value
	N (%)	N (%)		
Taglio cesareo	43 (63.2)	184 (84.4)	0.26 (0.11–0.58)	<0.001
Maternal inflammatory response – stadio 1	11 (16.2)	18 (8.3)	2.92 (1.04–8.19)	0.04
Maternal inflammatory response – stadio 3	11 (16.2)	11 (5)	4 (1.24–12.9)	0.02
PDA trattato	51 (75)	123 (56.4)	2.6 (1.16–5.83)	0.02
Ventilazione meccanica nelle prime 72 h	49 (72.1)	100 (45.9)	2.67 (1.23–5.79)	0.01
Emorragia cerebellare	30 (44.1)	18 (8.3)	8.14 (3.63–18.24)	<0.001
OR = odds ratio; CI = intervallo di confidenza				

Fattori di rischio per emorragia cerebellare

L'età gestazionale media ($26,6 \pm 2$ vs $28,6 \pm 2,1$ settimane) e il peso alla nascita (904 ± 254 vs 1067 ± 258 g) sono risultati significativamente più bassi nei neonati con CBH ($P = 0,0001$). Nell'analisi univariata, intubazione, ventilazione meccanica, surfattante, PDA emodinamicamente significativo, supporto con inotropi, sepsi ad esordio tardivo e GMH-IVH erano significativamente più frequenti (Tabella 10).

Tra i fattori placentari, né la malperfusionazione vascolare materna o fetale né la corioamnionite istologica (sia lato materno che fetale) sono risultate associate a questa lesione nella nostra coorte. Nell'analisi multivariata (Tabella 11), età gestazionale inferiore, supporto con inotropi entro 72 ore dalla nascita (OR, 5,24; IC 95%, 1,88-14,6) e presenza contemporanea di GMH-IVH (OR, 6,38; IC 95%), sono emersi come fattori di rischio indipendenti per CBH.

Tabella 10. Dati demografici, caratteristiche cliniche e reperti placentari dei neonati con e senza diagnosi di emorragia cerebellare (CBH)

	Popolazione (N = 286)	CBH (N = 48)	No CBH (N = 238)	P value
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	
Dati prenatali				
Sesso maschile	135 (47.2)	26 (54.2)	109 (45.8)	0.34
Ritardo di crescita intrauterino	78 (27.3)	8 (16.7)	70 (29.4)	0.08
Profilassi steroidea antenatale	224 (78.6)	32 (66.7)	192 (80.7)	0.04
Diabete materno	11 (3.8)	1 (2.1)	10 (4.2)	0.70
Preeclampsia	55 (19.2)	8 (16.7)	56 (23.5)	0.35
Gravidanza gemellare	110 (38.5)	19 (39.6)	91 (38.2)	0.87
Trasfusione feto-fetale	227 (79.4)	35 (72.9)	192 (80.7)	0.24
Dati postnatali				
Età gestazionale media (SD), settimane	28.2 ± 2.2	26.6 ± 2	28.6 ± 2.1	0.0001
Peso alla nascita media (SD), g	1040 ± 264	904 ± 254	1067 ± 258	0.0001
1' Apgar ≤ 5	114 (39.9)	23 (47.9)	91 (38.2)	0.26
5' Apgar ≤ 5	11 (3.8)	3 (6.2)	8 (3.4)	0.40
Intubazione nelle prime 72 ore	205 (71.7)	43 (89.6)	162 (68.1)	0.002
Ventilazione meccanica nelle prime 72 ore	149 (52.1)	32 (66.7)	117 (49.2)	0.03
Surfattante	200 (69.9)	43 (89.6)	157 (66)	0.001
Pneumotorace nelle prime 72 ore	11 (3.8)	3 (6.2)	8 (3.4)	0.40
Inotropi nelle prime 72 ore	24 (8.4)	13 (27.1)	11 (4.6)	0.0001
Sepsi precoce	10 (3.5)	3 (6.2)	7 (2.9)	0.38
Sepsi tardiva	131 (45.8)	34 (70.8)	97 (40.8)	0.0001
>1 sepsi tardiva	44 (15.4)	14 (29.2)	30 (12.6)	0.007
Enterocolite necrotizzante (NEC)	17 (5.9)	3 (6.2)	14 (5.9)	1
Terapia chirurgica per NEC	10 (3.5)	3 (6.2)	7 (2.9)	0.38
PDA trattato	174 (60.8)	32 (66.7)	142 (59.7)	0.42
PDA trattato chirurgicamente	31 (10.8)	13 (27.1)	18 (7.6)	0.0001
GMH-IVH	68 (23.8)	30 (62.5)	38 (18)	0.0001
Istologia placentare				
Placenta gemellare monocorionica	38 (13.3)	4 (8.3)	34 (14.3)	0.35
Inserzione velamentosa del funicolo	27 (9.4)	1 (2.1)	26 (10.9)	0.06
Fetal inflammatory response – stadio 1	23 (8)	4 (8.3)	19 (8)	1
Fetal inflammatory response – stadio 2	9 (3.1)	2 (4.2)	7 (2.9)	0.65
Fetal inflammatory response – stadio 3	23 (8)	7 (14.6)	16 (6.7)	0.08
Maternal inflammatory response – stadio 1	29 (10.1)	8 (16.7)	21 (8.8)	0.12
Maternal inflammatory response – stadio 2	37 (12.9)	8 (16.7)	29 (12.2)	0.48
Maternal inflammatory response – stadio 3	22 (7.7)	6 (12.5)	16 (6.7)	0.23
Villite di origine sconosciuta	31 (10.8)	4 (8.3)	27 (11.3)	0.80
Malperfusione vascolare materna	11 (3.8)	1 (2.1)	10 (4.2)	0.70
Malperfusione vascolare fetale	11 (3.8)	1 (2.1)	10 (4.2)	0.70
Ritardata maturazione dei villi	44 (15.4)	7 (14.6)	37 (15.5)	1
Ematoma retroplacentare	52 (18.2)	11 (22.9)	41 (17.2)	0.41

Tabella 11. Regressione logistica dei potenziali fattori di rischio per emorragia cerebellare (CBH)

	CBH (N = 48)	No CBH (N = 238)	OR (95%CI)	P value
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>		
Età gestazionale	26.6 ± 2	28.6 ± 2.1	0.76 (0.63–0.91)	0.003
Supporto con inotropi nelle prime 72 h	13 (27.1)	11 (4.6)	5.24 (1.88–14.6)	0.002
GMH-IVH	30 (62.5)	38 (18)	6.38 (3.02–13.5)	0.0001
OR = odds ratio; CI = intervallo di confidenza				

8. RICERCA DI NUOVI BIOMARKERS SU AMNIOS

Il proteoma rappresenta l'insieme di tutte le proteine, incluse tutte le isoforme e le modificazioni post-traduzionali, espresse contemporaneamente in un tessuto. Tramite recenti tecniche di proteomica esso può essere studiato per identificare e quantificare tutte le proteine coinvolte in un particolare processo. In tal modo è possibile ottenere moduli di coespressione proteica associati ad una particolare condizione, all'interno dei quali è poi possibile l'identificazione di una singola proteina candidata a diventare nuovo biomarker di tale condizione.

Per approfondire il ruolo della corioamnionite come fattore di rischio di danno cerebrale è stata effettuata una ricerca di possibili biomarkers precoci tramite analisi proteomica della membrana amniotica.

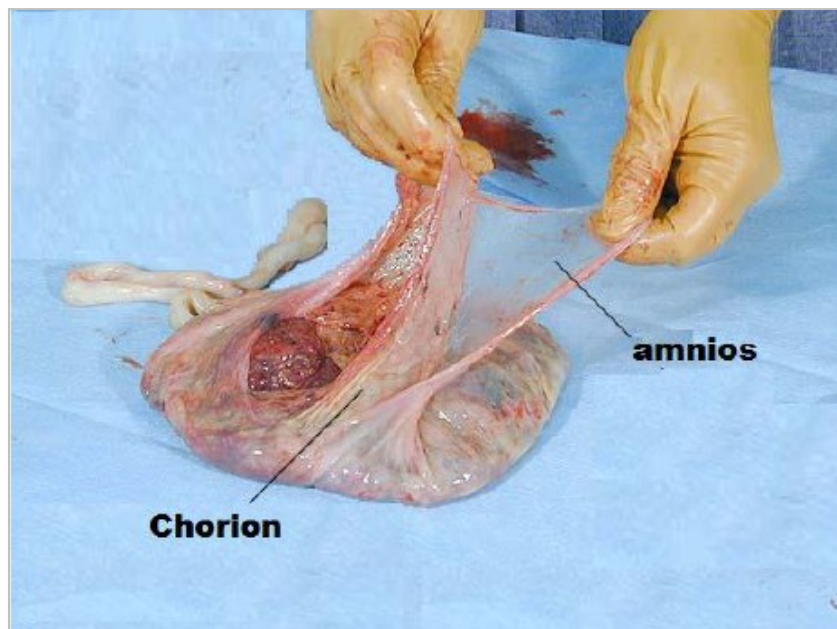
8.2 Metodi

Lo studio è stato condotto su una coorte di 52 neonati pretermine con età gestazionale alla nascita inferiore a 32 settimane, nati tra settembre 2017 e dicembre 2018. Le placente sono state raccolte dopo la nascita, come da protocollo per nascita pretermine, e inviate presso il Centro di Diagnostica Ginecopatologica e Patologia Feto-perinatale. Per isolare l'amnios dal corion è stato effettuato lo scollamento dei due strati delle membrane ostetriche (figura 20). Sulla membrana amniotica ricavata è stato quindi condotto uno studio di proteomica, che ha identificato la presenza di un pool proteico che è stato quindi analizzato tramite la

tecnica weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) ¹⁶⁸. Tale tecnica, ideata inizialmente da Steve Horvath per gli studi di genomica, è stata progressivamente sviluppata anche per dati di proteomica e metabolomica ¹⁶⁹.

Tramite la WGCNA, la matrice di proteine è stata suddivisa in moduli, ognuno dei quali caratterizzato da un simile profilo di espressione (co-espressione), quindi verosimilmente in relazione tra loro. I moduli così ottenuti sono stati messi quindi in correlazione con le principali variabili cliniche e caratteristiche placentari per poter identificare almeno un modulo di co-espressione significativamente associato ad una variabile tra quelle considerate. Un P-value pari o inferiore a 0.05 è stato considerato come significativo. Per l'analisi è stato usato l'R package per WGCNA ¹⁷⁰.

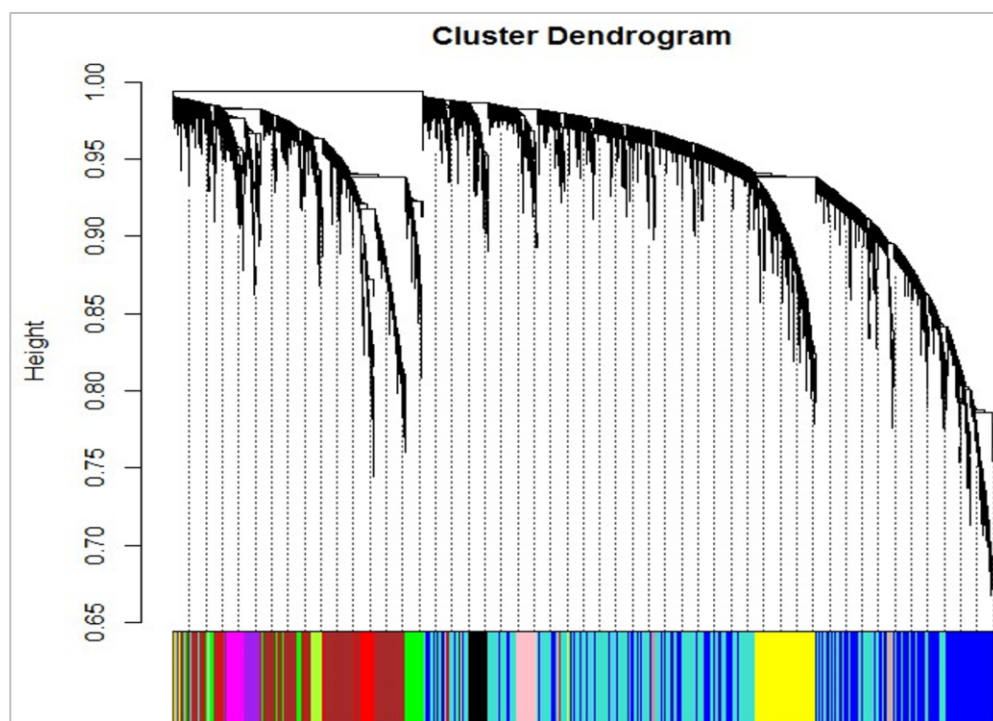
Figura 20. Scollamento di amnion e corion subito dopo il parto.



8.3 Risultati

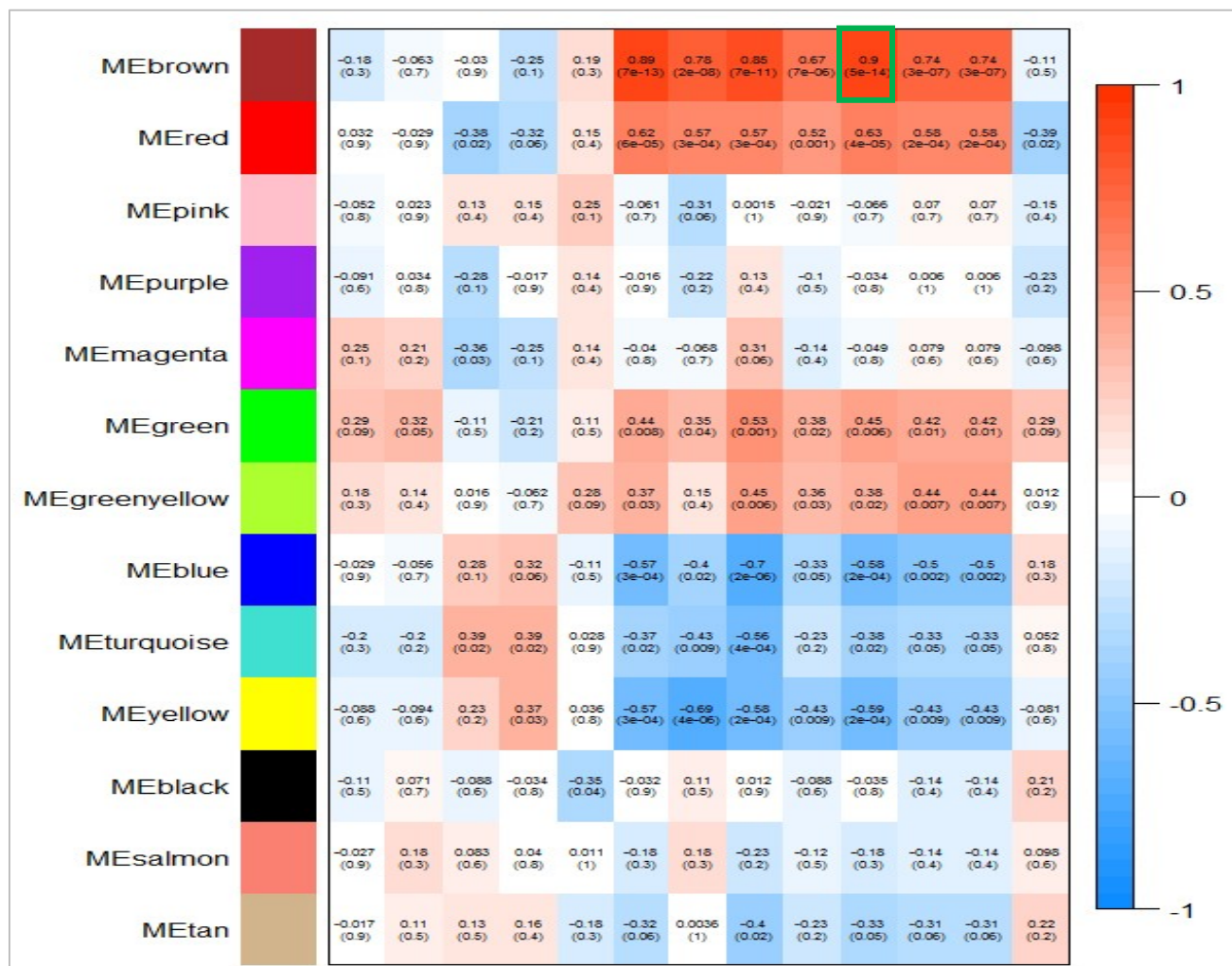
A partire da un pool di 6691 proteine abbiamo ottenuto 14 moduli di co-espressione proteica come rappresentato dal dendrogramma a cluster (figura 21).

Figura 21. Cluster dendrogram delle proteine dell'amnion. Ogni ramo rappresenta una protein e ogni colore in basso un modulo di co-espressione.



Per valutare l'associazione tra un modulo di co-espressione proteica e le variabili cliniche è stata tracciata la network heatmap di espressione in relazione alle variabili). Tale analisi, mostrata in Figura 22, ha evidenziato che il modulo di co-espressione Marrone (ME brown - FIRS) è significativamente associato alla presenza di corioamnionite istologica sul versante fetale rispetto agli altri moduli (indice di Pearson 0.9; $p < 0.05$).

Figura 22. Network heatmap di associazione tra variabili cliniche e placentari e moduli.
Evidenziato in verde il riquadro di significatività.



Questo studio rappresenta il primo passo per l'identificazione di un nuovo biomarker proteico di infiammazione intrauterina coinvolgente il versante fetale a partire dal pool proteico contenuto all'interno del modulo individuato.

9. AUTOREGOLAZIONE CEREBRALE E DANNO NEUROLOGICO

Dalla necessità di valutare il contributo del meccanismo di autoregolazione del flusso cerebrale nello sviluppo di lesioni cerebrali associate alla prematurità è nato il progetto di studio dal titolo “Cerebrovascular autoregulation and the risk of brain injury in preterm neonates with hypoxic stress” condotto dall’Unità di Terapia Intensiva Neonatale del Morgan Stanley Children Hospital (Columbia University). Lo studio vuole valutare se l’immaturità dei meccanismi di autoregolazione cerebrovascolare (intesi come la capacità di compensare fluttuazioni della pressione arteriosa sistemica) nel neonato estremamente pretermine sia associata ad un aumentato rischio di sviluppare un danno cerebrale da ipossia. Tale studio parte da presupposto che le fluttuazioni della near infrared spectroscopy (NIRS) cerebrale sembra siano direttamente correlate a fluttuazioni significative della mean arterial pressure (MAP) nei neonati estremamente prematuri, indicando un'autoregolazione cerebrovascolare immatura¹⁷¹. Lo studio è articolato in due parti, una preclinica, alla cui raccolta ed elaborazione iniziale dei dati ho partecipato, e una clinica. Nello studio clinico verranno raccolti e analizzati dati retrospettivi e prospettici circa la relazione tra variazione della MAP in risposta ad eventi ipossici, valori di NIRS e successivo rischio di danno della sostanza bianca, valutato tramite MR cerebrale all’età corretta del termine, in una corte di neonati pretermine nati prima delle 28 settimane gestazionali. È attualmente ancora in corso la raccolta dati di tale studio.

9.1 Studio preclinico su modello murino

Obiettivo. Per mimare l'effetto dell'imaturità dei sistemi di autoregolazione del flusso cerebrale sulle lesioni della sostanza bianca gli episodi di ipossia e bradicardia sono stati riprodotti nel topo per valutarne l'effetto sul flusso ematico, come dato indiretto del grado di ossigenazione cerebrale. Tale studio vuole dimostrare l'ipotesi che in topi esposti ad eventi ipossici che hanno prodotto un'alterazione del flusso cerebrale si evidenzia un grado più esteso e diffuso della sostanza bianca, rispetto ai topi che hanno mantenuto costante il flusso ematico cerebrale, pur in presenza di tali eventi.

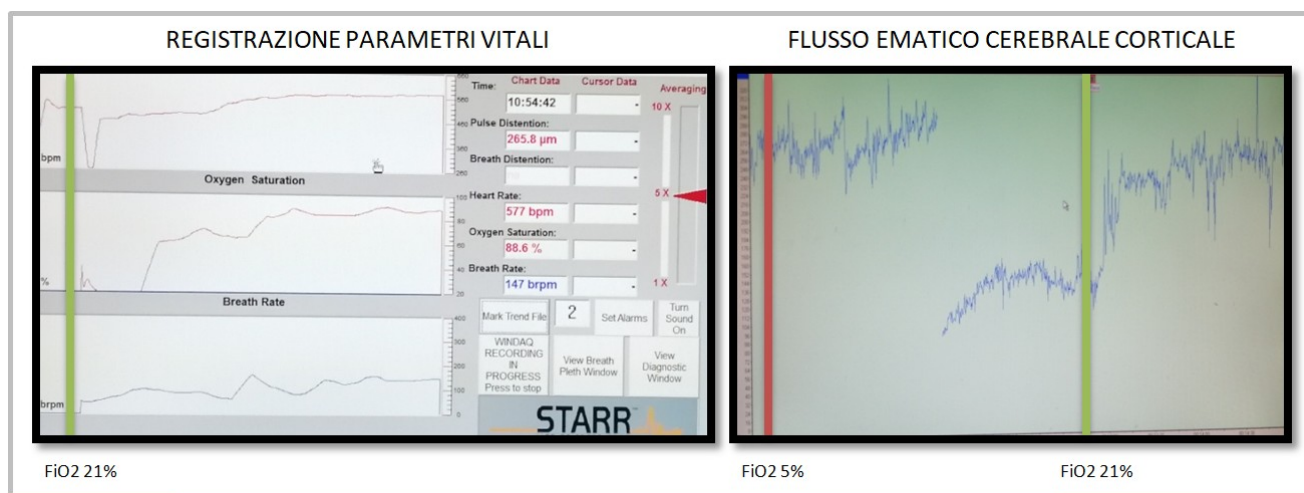
Metodi. Un campione di 25 topi neonati C57Bl/J (p2-p8) è stato esposto a ripetuti episodi di ipossia (FiO₂ 5%) per 30-90 secondi, fino alla riduzione del 55% della frequenza cardiaca basale (400 bpm), pari nel topo a 220 bpm. I topi sono stati posizionati in camera sigillata con flusso di aria con FiO₂ pari al 5% (azoto bilanciata). ed è stata valutata la variazione durante tali episodi di saturazione, frequenza cardiaca e frequenza respiratoria tramite un sensore (MouseOx Plus®) applicato attorno al collo (figura 23) e flusso ematico cerebrale (CBF) misurato con sensore doppler posizionato sulla superficie corticale del topo (Peliflux 5000, Sweden). In base all'individuale efficacia dell'autoregolazione cerebrale, i topi sono stati suddivisi in due gruppi e sacrificati a p15-p17 per valutare entità e caratteristiche del danno cerebrale all'analisi istologica del tessuto cerebrale, con specifica ricerca di degenerazione neuronale, estensione della mielinizzazione assonale e neuro infiammazione. I danni necrotici focali sono stati classificati tramite la scala di Cowan 172. Numero di protocollo IACUC: AC-AAAQ0464.

Figura 23. Sensore per rilevazione dei parametri vitali nel topo.



Risultati attesi. Attualmente è ancora in corso l'elaborazione dei dati. In figura 24 sono mostrate le registrazioni dei parametri vitali e del flusso cerebrale durante un episodio di ipossia marcata.

Figura 24. Andamento dei parametri vitali e del flusso cerebrale durante episodio ipossico in un modello murino (M7 a P5). In tale soggetto, i meccanismi di autoregolazione cerebrale compensano inizialmente la riduzione della saturazione arteriosa di ossigeno. Dopo ipossia prolungata (FiO2 5% per 76 secondi su totale di 80 secondi per tale soggetto) si assiste ad un drastico crollo del flusso cerebrale, rapidamente ristabilito dopo circa 4 secondi dalla riossigenazione a FiO2 pari al 21%.



Sulla base di studi precedenti ¹⁷³, si ipotizza che i topi in cui il flusso cerebrale rimane costante durante tali episodi presentano un danno più limitato della sostanza bianca, rispetto ai topi con significativa riduzione del flusso ematico cerebrale in corso di ipossia-bradicardia.

Se tale ipotesi fosse confermata, si potrebbero suggerire le basi fisiopatologiche secondo cui episodi frequenti e intermittenti di ipossia e bradicardia aumentano il rischio di danno cerebrale nei soggetti con monitoraggio NIRS alterato. Di conseguenza, una care perinatale che, tra i vari parametri, consideri e cerchi di mantenere nei range di normalità i valori di NIRS potrebbe avere un effetto neuroprotettivo significativo sul rischio di lesioni cerebrali associate alla prematurità.

10. DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni, i progressi nell'assistenza perinatale hanno contribuito a una riduzione consistente delle forme gravi di lesioni cerebrali legate alla prematurità come la leucomalacia periventricolare ¹⁷⁴. Tuttavia, gli stessi sforzi non sono stati altrettanto efficaci nel ridurre l'incidenza di GMH-IVH, che rimane una lesione cerebrale comune nei neonati pretermine interessando circa un terzo dei neonati con meno di 32 settimane di gestazione ¹⁷⁵.

I neonati estremamente prematuri sono anche a rischio di sviluppare CBH e, grazie all'implementazione della RM per lo studio del cervello neonatale, la prevalenza riportata di CBH nei neonati di basso peso alla nascita è passata dal 2% a quasi il 20% negli ultimi decenni ¹⁷⁶. Entrambe le lesioni hanno un impatto negativo significativo sullo sviluppo neurologico dei neonati prematuri ¹⁷⁷, sebbene la diagnosi di forme minori di emorragia sia spesso difficile con ecografia e RM convenzionale ¹⁷⁸, e l'entità dell'influenza sul neurosviluppo sia ancora oggetto di dibattito ¹⁷⁹.

L'eziologia multifattoriale e l'insorgenza precoce dopo la nascita di GMH-IVH e CBH rendono la loro prevenzione estremamente complessa ²⁸. Per questo motivo, sono stati fatti molti sforzi per comprendere a fondo la loro eziopatologia e i fattori di rischio associati. Una complessa interazione tra fattori ambientali e genetici contribuisce all'emorragia intraventricolare nei neonati prematuri ⁶¹.

Il ruolo dei fattori genetici ha recentemente guadagnato interesse, sebbene l'associazione con lo sviluppo di GMH-IVH non sia stata ancora del tutto chiarita ⁵¹. Gli

studi che indagano il ruolo della trombofilia sul rischio di sviluppare GMH-IVH identificano la trombosi dei vasi della matrice germinale come "primum movens" ¹⁸⁰⁻¹⁸³, sebbene siano stati pubblicati anche risultati contrastanti ¹⁸⁴. Allo stesso tempo, molti studi hanno riscontrato un aumento del rischio di GMH-IVH nei neonati con polimorfismi genetici di citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1 β , IL-6 e TNF- α e di geni associati alla regolazione della pressione e del flusso ematico cerebrale, come l'ossido nitrico sintetasi endoteliale ¹⁸⁵ e i geni del collagene di tipo IV ¹⁸⁶.

Come già emerge dalla letteratura, l'età gestazionale e il peso alla nascita giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di GMH-IVH e CBH ¹⁸⁷. Il nostro studio ha mostrato una forte relazione tra bassa età gestazionale alla nascita e CBH, in cui il rischio si riduce progressivamente ad età gestazionali successive.

È probabile, inoltre, che l'ambiente fetale influenzi significativamente lo sviluppo di GMH-IVH e CBH, a causa della loro precocità dopo la nascita. Poiché le caratteristiche macroscopiche e istologiche della placenta riflettono la qualità della vita intrauterina, diversi studi si sono quindi concentrati sulla patologia placentare al fine di valutare la possibile associazione con il rischio di sviluppare lesioni cerebrali neonatali ¹⁸⁸.

L'infiammazione / infezione intrauterina (corioamnionite) è tra le lesioni placentari più studiate associate a parto pretermine e potenzialmente a complicanze correlate al pretermine ¹⁸⁹. La relazione tra corioamnionite e sviluppo di GMH-IVH è però ancora oggetto di dibattito. Uno studio del 2012 non è riuscito a trovare alcuna associazione ¹⁶³, mentre la metanalisi di Villamor-Martinez et al. ha dimostrato che la corioamnionite sia clinica che istologica costituisce un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di GMH-IVH ¹⁹⁰. Nel 2018, Granger et al. hanno dimostrato la stessa associazione, sebbene dopo l'aggiustamento per le variabili perinatali, questa associazione sia scomparsa ¹⁹¹. Nello

stesso anno, uno studio multicentrico su 350 neonati prematuri non ha trovato alcuna associazione tra corioamnionite istologica e GMH-IVH diagnosticata con risonanza magnetica cerebrale postnatale precoce¹⁹². La metodologia eterogenea degli studi, i diversi criteri per diagnosi e stadiazione della corioamnionite e del danno cerebrale, e il miglioramento continuo dell'assistenza clinica dei neonati prematuri (ad esempio, l'introduzione della profilassi steroidea prenatale) potrebbero essere possibili spiegazioni di questa discrepanza¹⁹³. Abbiamo osservato che la corioamnionite istopatologica lieve e grave (stadi 1 e 3) che interessa il lato materno della placenta rappresenta un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di GMH-IVH. D'altro canto, la risposta infiammatoria fetale, caratterizzata da vasculite corionica e diversi stadi di funisite, è risultata significativamente più frequente nel gruppo GMH-IVH solo in caso di forme moderate (risposta infiammatoria fetale di stadio 2), anche se tale associazione è scomparsa nell'analisi multivariata.

La relazione causale tra corioamnionite e GMH-IVH non è ancora chiara¹⁹⁴, sebbene i meccanismi plausibili includano l'effetto diretto delle citochine proinfiammatorie sul cervello¹⁹⁵, l'aumento della permeabilità della barriera cervello-sangue¹⁹⁶, e l'aumento del consumo di ossigeno cerebrale associato a infezione / infiammazione prenatale¹⁹⁷⁻¹⁹⁹.

Il principale meccanismo fisiopatologico ipotizzato per spiegare il possibile danno cerebrale indotto da uno stato infettivo/infiammatorio intrauterino è quello citochino-mediato. Il rilascio di mediatori infiammatori vasoattivi determina alterazione della permeabilità della barriera ematoencefalica, adesione cellulare intravasale, coagulazione e trombosi con conseguente danno endoteliale che favorisce il sanguinamento a livello della matrice germinativa e del sistema venoso subependimale. Le citochine proinfiammatorie, inoltre, possono avere un effetto citolitico diretto sulle cellule nervose e aumentare l'attività

della caspasi con conseguente aumentata apoptosi. Al danno diretto causato da elevati livelli di citochine fetali, si aggiungerebbe, secondo alcuni Autori, una scarsa capacità del nato pretermine di tamponare l'effetto delle citochine proinfiammatorie e di altri mediatori dell'inflammatione e di prevenire/ridurre lo stress ossidativo ²⁰⁰.

Nel nostro studio, la componente materna dell'infezione intrauterina sembra giocare un ruolo importante nell'aumentare il rischio di GMH-IVH indipendentemente dalla presenza di risposta infiammatoria fetale. La nostra scoperta è coerente con la metanalisi di Villamor Martinez et al., che ha valutato l'effetto della funisite sullo sviluppo dell'emorragia intraventricolare ¹⁵⁶. In un'analisi di 13 studi riguardanti neonati con corioamnionite istologica con o senza funisite, gli autori non hanno trovato differenze significative nel rischio di GMH-IVH tra questi due gruppi.

La malperfusion vascolare materna è un reperto placentare comune nella nascita pretermine e può essere associata a preeclampsia, morte endouterina, ritardo della crescita intrauterina, lupus eritematoso sistemico e sindrome da anticorpi antifosfolipidi. La placenta di quasi la metà dei neonati VLBW nella nostra coorte ha mostrato segni di malperfusion vascolare materna. Nell'analisi univariata, i neonati con GMH-IVH avevano meno probabilità di presentare questa caratteristica placentare, ma dopo correzione per l'età gestazionale, questa associazione è scomparsa.

Per quanto riguarda invece le lesioni emorragiche cerebellari, nella nostra coorte le lesioni istopatologiche della placenta non si associavano ad un rischio più elevato di CBH. La mancanza di associazione tra insulto cerebellare e corioamnionite è coerente con una recente metanalisi, che include cinque studi in cui la corioamnionite diagnosticata clinicamente è stata valutata come un possibile fattore di rischio per CBH.

Sebbene la predisposizione a GMH-IVH e CBH possa potenzialmente seguire schemi perinatali comuni, è possibile che una diversa anatomia vascolare possa in parte modularne gli effetti, rendendo differenti i fattori di predisposizione di queste due regioni cerebrali all'emorragia. Sebbene l'anatomia della vena subependimale possa facilitare la congestione venosa che porta a GMH-IVH ²⁰¹, l'anatomia vascolare cerebellare non è stata studiata in dettaglio come potenziale fattore che contribuisce alla CBH. Inoltre, lo sviluppo cerebellare umano si estende dall'inizio del primo trimestre alla maturità del circuito finale, che viene raggiunta entro la fine del secondo anno postnatale ²⁰². La natura protratta dello sviluppo cerebellare umano rende questo organo particolarmente vulnerabile al danno dello sviluppo dopo la nascita, in cui le complicanze postnatali correlate alla prematurità possono avere un forte impatto sulla sua comparsa ²⁰³, mentre i disturbi della placenta prenatale possono non predisporre in modo significativo a tale lesione.

Tra i fattori di rischio perinatale e postnatale, abbiamo verificato che il taglio cesareo esercita un ruolo protettivo sullo sviluppo di GMH-IVH e CBH rispetto al parto vaginale. Alla stessa conclusione sono giunti due recenti studi, in cui è stato riscontrato che il taglio cesareo elettivo riduce i tassi di GMH-IVH in grandi coorti di neonati prematuri nati prima della 32^o settimana di gestazione ²⁰⁴. Per contro, il taglio cesareo urgente sembrerebbe aumentare il rischio di CBH ²⁰⁵. La protezione data dal taglio cesareo elettivo può essere spiegata dai vantaggi legati a un parto pretermine pianificato, tra cui una maggiore possibilità di somministrare profilassi steroidea e nelle tempistiche adeguate e profilassi antibiotica prima della nascita, un monitoraggio più attento delle condizioni fetali e, forse, una preparazione più efficiente del team di rianimazione neonatale ^{206,207}. Tuttavia, poiché abbiamo incluso sia i tagli cesarei urgenti sia quelli elettivi, non siamo in grado di confermare queste associazioni.

Sia le complicanze circolatorie che quelle respiratorie subito dopo la nascita predispongono i bambini a GMH-IVH. Nei neonati molto prematuri, la rianimazione cardiopolmonare²⁰⁸⁻²¹⁰, un elevato numero di tentativi di intubazione in sala parto²¹¹ e la ventilazione meccanica²¹² sono risultati fattori di rischio per GMH-IVH grave. Inoltre, diversi studi hanno riportato che l'ipotensione neonatale aumenta il rischio sia di GMH-IVH che di CBH nei neonati estremamente prematuri nei primi giorni di vita²¹³⁻²¹⁵, probabilmente a causa dell'imaturità dei meccanismi di autoregolazione cerebrale²¹⁶.

Il nostro studio ha confermato che un difficile adattamento alla vita extrauterina, dimostrato da Apgar a 5 minuti <5, instabilità emodinamica causata dalla pervietà del dotto arterioso, ipotensione, necessità di somministrazione di surfattante, intubazione e ventilazione meccanica precoce, predispone il neonato pretermine a GMH-IVH e CBH. Come riportato in studi precedenti⁵⁶, la sepsi postnatale è associata a GMH-IVH e CBH nella nostra coorte, sebbene il suo effetto sia mitigato se corretto per l'età gestazionale. Nell'analisi multivariata, il PDA trattato farmacologicamente e la ventilazione meccanica entro le prime 72 ore sono rimasti fattori significativi che predispongono i neonati a GMH-IVH, mentre l'ipotensione trattata con inotropi entro le prime 72 ore di vita è risultato essere un fattore di rischio indipendente per CBH.

Nel nostro studio è inoltre emerso che il rischio di avere entrambe le lesioni è risultato essere significativamente elevato (OR di avere GMH-IVH in presenza di CBH pari al 6,38 e di avere CBH in caso di GMH-IVH pari al 8,14 nella nostra popolazione).

È interessante notare che le origini anatomiche cerebrali e cerebellari del sanguinamento condividono una funzione simile²¹⁷, matrice germinale per GMH-IVH e strato granulare esterno per CBH, aree in cui i neuroni vengono prodotti prima di prendere il loro destino migratorio finale. Inoltre, la maggior parte della migrazione neuronale ha già

avuto luogo nella matrice germinale quando può verificarsi GMH-IVH, mentre lo strato granulare esterno rimane attivo nei neonati sani fino a pochi mesi dopo la nascita ²¹⁸. Sugeriamo che i neonati pretermine a rischio di una lesione dovrebbero essere monitorati sia per GMH-IVH che per CBH.

Un punto di forza del nostro studio è stato l'uso della RM con sequenze SWI per rilevare anche forme minori di emorragia che potrebbero sfuggire al rilevamento non solo mediante ecografia ma anche da studi di RM convenzionali ²¹⁹. Inoltre, abbiamo considerato entrambe le forme di emorragia, GMH-IVH e CBH. Poiché vi è un'urgente necessità di standardizzare i reperti placentari, abbiamo esaminato le sezioni placentari di ogni neonato incluso secondo la recente classificazione istologica dell'Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement ¹⁵⁴, che fornisce una descrizione dettagliata, uniforme e completa delle lesioni placentari macroscopiche e microscopiche.

Il nostro studio sottolinea l'importanza dell'assistenza postnatale nel primo periodo neonatale nella riduzione del rischio di GMH -IVH e CBH. Inoltre, i nostri dati confermano che la presenza di infezione / infiammazione intrauterina può svolgere un ruolo significativo nel predisporre i neonati pretermine a GMH-IVH e rafforzare l'importanza della prevenzione delle infezioni prenatali. Nonostante il ruolo intuitivo dell'influenza prenatale nelle lesioni neonatali precoci come GMH-IVH e CBH, l'eziologia multifattoriale di queste lesioni e la forte influenza dei primi fattori postnatali possono modulare gli effetti individuali dell'ambiente prenatale sul conseguente rischio di GMH-IVH e CBH.

In conclusione, il fattore più importante per capire il coinvolgimento del futuro neonato, del suo essere più o meno “pre-condizionato” dallo stato materno, più o meno pronο a sviluppare patologie neonatali, è la presenza di FIRS (Fetal Inflammatory Response Syndrome), che è verosimile debba prevedere l'infiammazione della membrana amniotica e

presentare valori di proteomica significativamente alterati sul versante fetale a dimostrazione del coinvolgimento di questa componente. Rimane indiscutibile la multifattorialità delle lesioni cerebrali ed il preponderante ruolo dell'età gestazionale nella loro insorgenza. Tali osservazioni, insieme alla doverosa continua ricerca di biomarker plausibili come il nostro studio ha cercato di dimostrare, sottolineano l'importanza della ottimizzazione del timing del parto prematuro, nel quale il bilancio tra rischi di una nascita troppo pretermine ed i benefici dall'escludere il feto/neonato da un ambiente ostile, quale quello gravidico in corso di infiammazione, vanno ponderati con estrema accortezza.

11. BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>.
2. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008 5;371(9606):75-84.
3. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012;379(9832):2162e72
4. Ancel P-Y, Goffinet F, EPIPAGE-2 Writing Group, Kuhn P, Langer B, Matis J, Hernandorena X, et al. Survival and Morbidity of Preterm Children Born at 22 Through 34 Weeks' Gestation in France in 2011: Results of the EPIPAGE-2 Cohort Study. *JAMA Pediatr* (2011)
5. Younge N, Goldstein RF, Bann CM, Hintz SR, Patel RM, Smith PB, et al. Survival and neurodevelopmental outcomes among periviable infants. *N Engl J Med*. 2017;376(7):617–28.
6. Ananth CV, Vintzileos AM. Epidemiology of preterm birth and its clinical subtypes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 773–82.
7. Ananth CV, Joseph KS, Oyelese Y, Demissie K, Vintzileos AM. Trends in preterm birth and perinatal mortality among singletons: United States, 1989 through 2000. *Obstet Gynecol* 2005; 105: 1084–91.
8. Romero R, Espinoza J, Kusanovic J, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG* 2006; 113: 17–42.
9. Liggins GC, Fairclough RJ, Grieves SA, Forster CS, Knox BS. Parturition in the sheep. *Ciba Found Symp* 1977; 47: 5–30.
10. Sfakianaki AK, Norwitz ER. Mechanisms of progesterone action in inhibiting prematurity. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006; 19: 763–72.
11. Garfield RE, Gasc JM, Baulieu EE. Effects of the antiprogestosterone RU 486 on preterm birth in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 1281–85.
12. Frey HA, Klebanoff MA. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(2):68-73.

13. Goldenberg RL, Culhane JF. Prepregnancy health status and the risk of preterm delivery. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159: 89–90.
14. Nadeau HC, Subramaniam A, Andrews WW. Infection and preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(2):100-5.
15. Knox IC Jr, Hoerner JK. The role of infection in premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1950; 59: 190–94.
16. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000. 342: 1500–07.
17. Ville Y, Rozenberg P. Predictors of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;52:23-32.
18. Hitti J, Riley DE, Krohn MA, et al. Broad-spectrum bacterial rDNA polymerase chain reaction assay for detecting amniotic fluid infection among women in premature labor. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1228–32.
19. Gardella C, Riley DE, Hitti J, Agnew K, Krieger JN, Eschenbach D. Identification and sequencing of bacterial rDNAs in culture-negative amniotic fluid from women in premature labor. *Am J Perinatol* 2004; 21: 319–23.
20. Mueller-Heubach E, Rubinstein DN, Schwarz SS. Histologic chorioamnionitis and preterm delivery in different patient populations. *Obstet Gynecol* 1990; 75: 622–26.
21. Patel RM. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol*. 2016 Feb;33(3):318-28.
22. Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*. 2008 Jan 19;371(9608):261-9.
23. Patel RM. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Am J Perinatol*. 2016 Feb;33(3):318-28.
24. Gonçalves DMM, Wandalsen GF, Scavacini AS, Lanza FC, Goulart AL, Solé D, Dos Santos AMN. Pulmonary function in former very low birth weight preterm infants in the first year of life. *Respir Med*. 2018 Mar;136:83-87.
25. Nair J, Longendyke R, Lakshminrusimha S. Necrotizing Enterocolitis in Moderate Preterm Infants. *Biomed Res Int*. 2018 Oct 10;2018:4126245.
26. Glass HC, Costantino AT, Stayer SA, Brett CM, Cladis F, Davis PJ. Outcomes for extremely premature infants. *Anesth Analg*. 2015 Jun;120(6):1337-51.
27. Brew N, Walker D, Wong FY. Cerebral vascular regulation and brain injury in preterm infants. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Jun;306(11):R773-86.

28. Sannia A, Natalizia AR, Parodi A, Malova M, Fumagalli M, Rossi A, Ramenghi LA. Different gestational ages and changing vulnerability of the premature brain. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Nov;28 Suppl 1:2268-72.
29. Counsell SJ, Maalouf EF, Fletcher AM, Duggan P, Battin M, Lewis HJ, et al. MR imaging assessment of myelination in the very preterm brain. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002 May;23(5):872–81.
30. Shalak L, Perlman JM. Hemorrhagic-ischemic cerebral injury in the preterm infant: current concepts. *Clin Perinatol.* 2002 Dec;29(4):745-63.
31. Whitelaw A. Intraventricular haemorrhage and posthaemorrhagic hydrocephalus: pathogenesis, prevention and future interventions. *Semin Neonatol.* 2001 Apr;6(2):135-46.
32. Duncan CC, Ment LR. Intraventricular hemorrhage and prematurity. *Neurosurg Clin N Am.* 1993 Oct;4(4):727-34.
33. Dolfin T, Skidmore MB, Fong KW, Hoskins EM, Shennan AT. Incidence, severity, and timing of subependymal and intraventricular hemorrhages in preterm infants born in a perinatal unit as detected by serial real-time ultrasound. *Pediatrics.* 1983 Apr;71(4):541.
34. Perlman JM, Rollins N. Surveillance protocol for the detection of intracranial abnormalities in premature neonates. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2000 Aug;154(8):822-6.
35. Donat JF, Okazaki H, Kleinberg F, Reagan TJ. Intraventricular hemorrhages in full-term and premature infants. *Mayo Clin Proc.* 1978 Jul;53(7):437-41. PMID: 661382.
36. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention. *Brain Dev.* 1997 Dec;19(8):519-34.
37. Kostović I. Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. *Prog Brain Res.* 1990;85:223-39.
38. P Kostović I, Judas M, Rados M, Hrabac P. Laminar organization of the human fetal cerebrum revealed by histochemical markers and magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex.* 2002 May;12(5):536-44.
39. Huttenlocher PR, de Courten C. The development of synapses in striate cortex of man. *Hum Neurobiol.* 1987;6(1):1-9.
40. Luo J, Luo Y, Zeng H, Reis C, Chen S. Research Advances of Germinal Matrix Hemorrhage: An Update Review. *Cell Mol Neurobiol.* 2019 Jan;39(1):1-10.
41. Ballabh P, Xu H, Hu F, Braun A, Smith K, Rivera A, Lou N, Ungvari Z, Goldman SA, Csiszar A, Nedergaard M. Angiogenic inhibition reduces germinal matrix hemorrhage. *Nat Med.* 2007 Apr;13(4):477-85.

42. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004 Jun;16(1):1-13. doi: 10.1016/j.nbd.2003.12.016.
43. Braun A, Xu H, Hu F, et al. Paucity of pericytes in germinal matrix vasculature of premature infants. *J Neurosci.* 2007;27(44):12012–12024.
44. Xu H, Hu F, Sado Y, et al. Maturation changes in laminin, fibronectin, collagen IV, and perlecan in germinal matrix, cortex, and white matter and effect of betamethasone. *J Neurosci Res.* 2008 15;86(7):1482-500.
45. El-Khoury N, Braun A, Hu F, et al. Astrocyte end-feet in germinal matrix, cerebral cortex, and white matter in developing infants. *Pediatr Res.* 2006;59(5):673–679.
46. Cole VA, Durbin GM, Olafsson A, Reynolds EO, Rivers RP, Smith JF. Pathogenesis of intraventricular haemorrhage in newborn infants. *Arch Dis Child.* 1974 Sep;49(9):722-8.
47. Tortora D, Severino M, Malova M, Parodi A, Morana G, Sedlacik J, Govaert P, Volpe JJ, Rossi A, Ramenghi LA. Differences in subependymal vein anatomy may predispose preterm infants to GMH-IVH. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2018 Jan;103(1):F59-F65.
48. Ballabh P. Pathogenesis and prevention of intraventricular hemorrhage. *Clin Perinatol.* 2014 Mar;41(1):47-67.
49. Pape e Wigglesworth Pape KE, Wigglesworth JS (1979). Haemorrhage, ischaemia and perinatal brain. In: K Pape, J Wigglesworth (Eds.), *Clinics in developmental medicine* no. 69/70. SIMP/Heinemann, London, pp. 133–148.
50. Moody DM, Brown WR, Challa VR et al. Alkaline phosphatase histochemical staining in the study of germinal matrix hemorrhage and brain vascular morphology in a very-low-birth-weight neonate. *Pediatr Res.* 1994;35.
51. Ghazi-Birry HS, Brown WR, MoodyDMet al. (1997). Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol* 18: 219–229.
52. du Plessis AJ. Cerebrovascular injury in premature infants: current understanding and challenges for future prevention. *Clin Perinatol.* 2008 Dec;35(4):609-41.
53. Vesoulis ZA, Mathur AM. Cerebral Autoregulation, Brain Injury, and the Transitioning Premature Infant. *Front Pediatr.* 2017 Apr 3;5:64. doi: 10.3389/fped.2017.00064.
54. Soul JS, Hammer PE, Tsuji M, Saul JP, Bassan H, Limperopoulos C, et al. Fluctuating pressure-passivity is common in the cerebral circulation of sick premature infants. *Pediatr Res* (2007) 61:467–73.
55. Vesoulis ZA, Liao SM, Trivedi SB, Ters NE, Mathur AM. A novel method for assessing cerebral autoregulation in preterm infants using transfer function analysis. *Pediatr Res* (2016) 79(3):453–9. doi:10.1038/pr.2015.238.

56. Khanafer-Larocque I, Soraisham A, Stritzke A, Al Awad E, Thomas S, Murthy P, et al. Intraventricular Hemorrhage: Risk Factors and Association With Patent Ductus Arteriosus Treatment in Extremely Preterm Neonates. *Front Pediatr*. 2019 Oct 22;7:408.
57. Lim J, Hagen E. Reducing Germinal Matrix-Intraventricular Hemorrhage: Perinatal and Delivery Room Factors. *Neoreviews*. 2019 Aug;20(8):e452-e463.
58. Roberts JC, Javed MJ, Hocker JR, Wang H, Tarantino MD. Risk factors associated with intraventricular hemorrhage in extremely premature neonates. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2018 Jan;29(1):25-29.
59. Sarkar S, Bhagat I, Dechert R, Schumacher RE, Donn SM. Severe intraventricular hemorrhage in preterm infants: comparison of risk factors and short-term neonatal morbidities between grade 3 and grade 4 intraventricular hemorrhage. *Am J Perinatol*. 2009 Jun;.
60. Ramenghi LA, Fumagalli M, Groppo M, Consonni D, Gatti L, Bertazzi PA, et al. Germinal matrix hemorrhage: intraventricular hemorrhage in very-low-birth-weight infants: the independent role of inherited thrombophilia. *Stroke*. 2011;42(7):1889–1893.
61. Ment LR, Ådén U, Bauer CR, Bada HS, Carlo WA, Kaiser JR, et al; Gene Targets for IVH Study Group and the Neonatal Research Network. Genes and environment in neonatal intraventricular hemorrhage. *Semin Perinatol*. (2015) 39(8):592-603.
62. Ryckman KK, Dagle JM, Kelsey K, Momany AM, Murray JC. Replication of genetic associations in the inflammation, complement, and coagulation pathways with intraventricular hemorrhage in LBW preterm neonates. *Pediatric research*. Jul; 2011 70(1):90–95.
63. Harteman JC, Groenendaal F, van Haastert IC, et al. Atypical timing and presentation of periventricular haemorrhagic infarction in preterm infants: the role of thrombophilia. *Developmental medicine and child neurology*. Feb; 2012 54(2):140–147 .
64. Dodelson de Kremer R, Grosso C. Maternal mutation 677C > T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene associated with severe brain injury in offspring. *Clinical genetics*. Jan; 2005 67(1):69–80.
65. Schreiner C, Suter S, Watzka M, et al. Genetic variants of the vitamin K dependent coagulation system and intraventricular hemorrhage in preterm infants. *BMC pediatrics*. 2014; 14:219.
66. de Vries LS, Koopman C, Groenendaal F, et al. COL4A1 mutation in two preterm siblings with antenatal onset of parenchymal hemorrhage. *Annals of neurology*. Jan; 2009 65(1):12–18 .
67. de Vries LS, Mancini GM. Intracerebral hemorrhage and COL4A1 and COL4A2 mutations, from fetal life into adulthood. *Annals of neurology*. Apr; 2012 71(4):439–441.

68. Vannemreddy P, Notarianni C, Yanamandra K, Napper D, Bocchini J. Is an endothelial nitric oxide synthase gene mutation a risk factor in the origin of intraventricular hemorrhage? *Neurosurg Focus.* Jan.2010 28(1):E11.
69. Poggi C, Giusti B, Vestri A, Pasquini E, Abbate R, Dani C. Genetic polymorphisms of antioxidant enzymes in preterm infants. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* Oct; 2012 25(Suppl 4):131–134.
70. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978 Apr;92(4):529-34.
71. Parodi A, Govaert P, Horsch S, Bravo MC, Ramenghi LA; eurUS.brain group. Cranial ultrasound findings in preterm germinal matrix haemorrhage, sequelae and outcome. *Pediatr Res.* 2020 Mar;87(Suppl 1):13-24.
72. Vasileiadis GT, Gelman N, Han VKM, et al. Uncomplicated intraventricular hemorrhage is followed by reduced cortical volume at near-term age. *Pediatrics* 2004;114:e367–e372.
73. Tam EWY, Miller SP, Studholme C, et al. Differential effects of intraventricular hemorrhage and white matter injury on preterm cerebellar growth. *J Pediatr* 2011;158:366–371.
74. Tortora D, Martinetti C, Severino M, et al. The effects of mild germinal matrix-intraventricular haemorrhage on the developmental white matter microstructure of preterm neonates: a DTI study. *Eur Radiol* 2018;28:1157–1166.
75. Tortora D, Severino M, Sedlacik J, Toselli B, Malova M, Parodi A, Morana G, Fato MM, Ramenghi LA, Rossi A. Quantitative susceptibility map analysis in preterm neonates with germinal matrix-intraventricular hemorrhage. *J Magn Reson Imaging.* 2018;48(5).
76. Volpe JJ. The Encephalopathy of Prematurity – Brain Injury and Impaired Brain Development Inextricably Intertwined. Vol. 16, *Seminars in pediatric neurology.* 2009 167–78.
77. Argyropoulou MI. Brain lesions in preterm infants: initial diagnosis and follow-up. *Pediatr Radiol.* 2010;40(6):811–8.
78. Rakic P, Sidman RL. Histogenesis of cortical layers in human cerebellum, particularly the lamina dissecans. *J Comp Neurol.* 1970;139(4):473–500.
79. Sidman RL, Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.* 1973;62(1):1–35.
80. Volpe JJ. Cerebellum of the premature infant: rapidly developing, vulnerable, clinically important. *J Child Neurol.* 2009 Sep;24(9):1085–104.

81. Carletti B, Rossi F. Neurogenesis in the cerebellum. *Neuroscientist*. 2008;14(1):91–100.
82. Fink AJ, Englund C, Daza RAM, Pham D, Lau C, Nivison M, et al. Development of the deep cerebellar nuclei: transcription factors and cell migration from the rhombic lip. *J Neurosci*. 2006;26(11):3066–76.
83. Hibi M, Shimizu T. Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol*. 2012;72(3):282–301.
84. Ten Donkelaar HJ, Lammens M. Development of the human cerebellum and its disorders. *Clin Perinatol*. 2009;36(3):513-30.
85. ten Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Thijssen HO, Renier WO. Development and developmental disorders of the human cerebellum. *J Neurol*. 2003;250(9):1025-36.
86. Limperopoulos C, Soul JS, Gauvreau K, Huppi PS, Warfield SK, Bassan H, et al. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. *Pediatrics*. 2005;115(3):688–95.
87. Tam EWY. Cerebellar injury in preterm infants. *Handb Clin Neurol*. 2018;155:49-59.
88. Parodi A, Rossi A, Severino M, Morana G, Sannia A, Calevo MG, et al. Accuracy of ultrasound in assessing cerebellar haemorrhages in very low birthweight babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015 Jul;100(4):F289-92.
89. Haines KM, Wang W, Pierson CR. Cerebellar hemorrhagic injury in premature infants occurs during a vulnerable developmental period and is associated with wider neuropathology. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1:69.
90. Limperopoulos C, Benson CB, Bassan H, Disalvo DN, Kinnamon DD, Moore M, et al. Cerebellar hemorrhage in the preterm infant: ultrasonographic findings and risk factors. *Pediatrics*. 2005;116(3):717-24.
91. Villamor-Martinez E, Fumagalli M, Alomar YI, Passera S, Cavallaro G, Mosca F, et al. Cerebellar Hemorrhage in Preterm Infants: A Meta-Analysis on Risk Factors and Neurodevelopmental Outcome. *Front Physiol*. (2019) 25;10:800. doi: 10.3389/fphys.2019.00800.
92. Vesoulis ZA, Herco M, El Ters NM, Whitehead HV, Mathur A. Cerebellar hemorrhage: a 10-year evaluation of risk factors. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020;33(21):3680-3688.
93. Martino F, Malova M, Cesaretti C, Parazzini C, Doneda C, Ramenghi LA, et al. Prenatal MR imaging features of isolated cerebellar haemorrhagic lesions. *Eur Radiol*. 2016 Aug;26(8):2685–96.
94. Pierson CR, Al Sufiani F. Preterm birth and cerebellar neuropathology. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(5):305–11.
95. Messerschmidt A, Prayer D, Brugger PC, Boltshauser E, Zoder G, Sterniste W, et al. Preterm birth and disruptive cerebellar development: assessment of perinatal risk factors. *Eur J Paediatr Neurol*. 2008;12(6):455–60.

96. Savman K, Nilsson UA, Blennow M, Kjellmer I, Whitelaw A. Non-protein-bound iron is elevated in cerebrospinal fluid from preterm infants with posthemorrhagic ventricular dilatation. *Pediatr Res*. 2001;49(2):208–12.
97. Messerschmidt A, Fuiko R, Prayer D, Brugger PC, Boltshauser E, Zoder G, et al. Disrupted cerebellar development in preterm infants is associated with impaired neurodevelopmental outcome. *Eur J Pediatr*. 2008;167(10):1141–7.
98. Messerschmidt A, Brugger PC, Boltshauser E, Zoder G, Sterniste W, Birnbacher R, et al. Disruption of cerebellar development: potential complication of extreme prematurity. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005;26(7):1659–67.
99. Steggerda SJ, de Bruine FT, Smits-Wintjens VEJ, Verbon P, Walther FJ, van Wezel-Meijler G. Posterior fossa abnormalities in high-risk term infants: comparison of ultrasound and MRI. *Eur Radiol*. 2015 Sep;25(9):2575–83.
100. Steggerda SJ, Leijser LM, Walther FJ, van Wezel-Meijler G. Neonatal cranial ultrasonography: how to optimize its performance. *Early Hum Dev*. 2009;85(2):93–9.
101. Enriquez G, Correa F, Aso C, Carreno JC, Gonzalez R, Padilla NF, et al. Mastoid fontanelle approach for sonographic imaging of the neonatal brain. *Pediatr Radiol*. 2006;36(6):532–40.
102. Leijser LM, Liauw L, Veen S, de Boer IP, Walther FJ, van Wezel-Meijler G. Comparing brain white matter on sequential cranial ultrasound and MRI in very preterm infants. *Neuroradiology*. 2008 Sep;50(9):799–811.
103. Counsell SJ, Rutherford MA, Cowan FM, Edwards AD. Magnetic resonance imaging of preterm brain injury. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2003;88(4):F269–74.
104. Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2004;16(3):367–78.
105. Riva D, Giorgi C. The contribution of the cerebellum to mental and social functions in developmental age. *Fiziol Cheloveka*. 2000;26(1):27–31.
106. Leiner HC, Leiner AL, Dow RS. Cognitive and language functions of the human cerebellum. *Trends Neurosci*. 1993 Nov;16(11):444–7.
107. Zayek MM, Benjamin JT, Maertens P, Trimm RF, Lal C V, Eyal FG. Cerebellar hemorrhage: a major morbidity in extremely preterm infants. *J Perinatol*. 2012 Sep;32(9):699–704.
108. Johnsen SD, Bodensteiner JB, Lotze TE. Frequency and nature of cerebellar injury in the extremely premature survivor with cerebral palsy. *J Child Neurol*. 2005;20(1):60–4.
109. Bodensteiner JB, Johnsen SD. Magnetic resonance imaging (MRI) findings in children surviving extremely premature delivery and extremely low birthweight with cerebral palsy. *J Child Neurol*. 2006;21(9):743–7.

110. Timmann D, Daum I. How consistent are cognitive impairments in patients with cerebellar disorders? *Behav Neurol*. 2010;23(1–2):81–100.
111. Allin MPG, Salaria S, Nosarti C, Wyatt J, Rifkin L, Murray RM. Vermis and lateral lobes of the cerebellum in adolescents born very preterm. *Neuroreport*. 2005 Nov;16(16):1821–4.
112. Tran L, Huening BM, Kaiser O, Schweiger B, Sirin S, Quick HH, et al. Cerebellar-dependent associative learning is impaired in very preterm born children and young adults. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):18028.
113. Steggerda SJ, De Bruine FT, van den Berg-Huysmans AA, Rijken M, Leijser LM, Walther FJ, et al. Small cerebellar hemorrhage in preterm infants: perinatal and postnatal factors and outcome. *Cerebellum*. 2013;12(6):794–801.
114. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2008;93(2):F153–61.
115. Volpe JJ, Kinney HC, Jensen FE, Rosenberg PA. The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant. *Int J Dev Neurosci*. 2011 Jun;29(4):423–40.
116. Ramenghi LA, Supramaniam V, Fumagalli M, Rutherford M. Brain development and perinatal vulnerability to cerebral damage. In: Buonocore G, et al., eds. *Neonatology. A practical approach to neonatal diseases*. Milan: Springer Italia; 2011:1063–73.
117. Rutherford MA, Supramaniam V, Ederies A, et al. Magnetic resonance imaging of white matter diseases of prematurity. *Neuroradiology* 2010;52:505–21.
118. Volpe JJ. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *Lancet Neurol* 2009;8:110–24.
119. Back SA. Perinatal white matter injury: the changing spectrum of pathology and emerging insights into pathogenetic mechanisms. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2006;12(2):129–140.
120. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2008;93:F153–61.
121. Kinney HC, Back SA. Human oligodendroglial development: relationship to periventricular leukomalacia. *Semin Pediatr Neurol*. 1998;5(3):180–9.
122. Wisnowski JL, Bluml S, Paquette L, Zelinski E, Nelson MDJ, Painter MJ, et al. Altered glutamatergic metabolism associated with punctate white matter lesions in preterm infants. *PLoS One*. 2013;8(2):e56880.
123. Back SA, Miller SP. Brain injury in premature neonates: A primary cerebral dysmaturation disorder? *Ann Neurol* 2014;75(4): 469–486.
124. Banker BQ, Larroche JC (1962). Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. *Arch Neurol* 7: 386–410 .

125. Back SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2017 Sep;134(3):331-349. doi: 10.1007/s00401-017-1718-6.
126. Pierson CR, Folkerth RD, Billiards SS, et al. Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant. *Acta Neuropathol* 2007;114: 619–631.
127. van Haastert IC, Groenendaal F, Uiterwaal CS, et al. Decreasing incidence and severity of cerebral palsy in prematurely born children. *J Pediatr* 2011; 159(1):86–91.e1.
128. Buser JR, Maire J, Riddle A, et al. Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Ann Neurol.* 2012;71: 93–109.
129. Hamrick SE, Miller SP, Leonard C, et al. Trends in severe brain injury and neurodevelopmental outcome in premature newborn infants: the role of cystic periventricular leukomalacia. *J Pediatr.* 2004;145: 593–599.
130. Miller SP, Cozzio CC, Goldstein RB, et al. Comparing the diagnosis of white matter injury in premature newborns with serial MR imaging and transfontanel ultrasonography findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24:1661–1669.
131. André P, Thébaud B, Delavaucoupet J, et al. Late-onset cystic periventricular leukomalacia in premature infants: a threat until term. *Am J Perinatol* 2001;18(2):79–86.
132. Verboon-Maciolek MA, Groenendaal F, Hahn CD, et al. Human parechovirus causes encephalitis with white matter injury in neonates. *Ann Neurol* 2008;64(3):266–273.
133. Maalouf EF, Duggan PJ, Counsell SJ, et al. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics* 2001;107:719–27.
134. Kersbergen KJ, de Vries LS, Groenendaal F, Corticospinal tract injury precedes thalamic volum reduction in preterm infants with cystic periventricular leukomalacia, 2015. *J Pediatr.* 2015 Aug;167(2):260-8.
135. Childs AM, Cornette L, Ramenghi LA, et al. Magnetic resonance and cranial ultrasound characteristics of periventricular white matter abnormalities in newborn infants. *Clin Radiol* 2001;56:647–55.
136. De Vries et al. Progress in Neonatal Neurology with a Focus on Neuroimaging in the Preterm Infant. *Neuropediatrics* 2015;46:234–241.
137. LG Cornette, SF Tanner, LA Ramenghi, Magnetic resonance imaging of the infant brain: anatomical characteristics and clinical significance of punctate lesions, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;86(3):F171-7.
138. Niwa T, et al. Punctate white matter lesions in infants: new insights using susceptibility-weighted imaging. *Neuroradiology.* 2011;53:669–679.

139. Deng W, Wang H, Rosenberg PA, et al. Role of metabotropic glutamate receptors in oligodendrocytes excitotoxicity and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:7751–6.
140. LG Cornette, SF Tanner, LA Ramenghi. Magnetic resonance imaging of the infant brain: anatomical characteristics and clinical significance of punctate lesions, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2002;86(3):F171-7.
141. Inder TE, Wells SJ, Mogridge NB et al. Defining the nature of the cerebral abnormalities in the premature infant: a qualitative magnetic resonance imaging study. *J Pediatr* 2003; 143(2):171–179 .
142. Chau V, Brant R, Poskitt KJ, Tam EWY, Synnes A, Miller SP. Postnata infection is associated with widespread abnormalities of brain development in premature newborns. *Pediatr Res* 2012 e 71:274-9.1.
143. Leijser LM , Steggerda SJ , de Bruïne FT , van der Grond J , Walther FJ , van Wezel- Meijler G . Brain imaging findings in very preterm infants throughout the neonatal period. II. Relation with perinatal clinical data. *Early Hum Dev* 2009;85.
144. Wagenaar N, Chau V, Groenendaal F, et al. Clinical Risk Factors for Punctate White Matter Lesions on Early Magnetic Resonance Imaging in Preterm Newborns. *J Pediatr.* 2017;182:34-40.e1
145. Kersbergen KJ, Benders MJ, Groenendaal F, Koopman-Esseboom C, Nievelstein RA, van Haastert IC, de Vries LS. Different patterns of punctate white matter lesions in serially scanned preterm infants. *PLoS One.* 2014 Oct 3;9(10):e108904.
146. Niwa T et al. Punctate white matter lesions in infants: new insights using susceptibility-weighted imaging. *Neuroradiology* (2011) 53:669–679.
147. Dyet LE, Kennea N, Counsell SJ, et al. Natural history of brain lesions in extremely preterm infants studied with serial magnetic resonance imaging from birth and neurodevelopmental assessment. *Pediatrics* 2006;118:536–48.
148. Inder T, Huppi PS, Zientara GP, et al. Early detection of periventricular leukomalacia by diffusion-weighted magnetic resonance imaging techniques. *J Pediatr* 1999;134(5):631–634.
149. Haacke EM, Mittal S, Wu Z, et al. Susceptibility-weighted imaging: technical aspects and clinical applications, part 1. *Am J Neuroradiol* 2009;30:19–30.
150. Guttmacher AE, Maddox YT, Spong CY. The Human Placenta Project: placental structure, development, and function in real time. *Placenta.* 2014 May;35(5):303-4.
151. Maltepe E, Fisher SJ. Placenta: the forgotten organ. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015;31:523-52.
152. Dockery P, Bermingham J, Jenkins D. Structure-function relations in the human placenta. *Biochem Soc Trans.* 2000 Feb;28(2):202-8.
153. Enders AC, Carter AM. Review: The evolving placenta: different developmental paths to a hemochorial relationship. *Placenta.* 2012 Feb;33 Suppl:S92-8.

154. Khong TY, Mooney EE, Ariel I, Balmus NCM, Boyd TK, Brundler M, et al. Sampling and Definitions of Placental Lesions, Amsterdam Placental Workshop Group Consensus Statement. *Arch Pathol Lab Med* (2016) 140:698-713.
155. Stojanovska V, Miller SL, Hooper SB, Polglase GR. The Consequences of Preterm Birth and Chorioamnionitis on Brainstem Respiratory Centers: Implications for Neurochemical Development and Altered Functions by Inflammation and Prostaglandins. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:26.
156. Villamor-Martinez E, Fumagalli M, Mohammed Rahim O, Passera S, Cavallaro G, Degraeuwe P, et al. Chorioamnionitis Is a Risk Factor for Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol*. (2018) 9:1253.
157. Redline Rw, Faye-Petersen O, Heller D, Qureshi F, Van Savell V, Vogler C. Amniotic Infection Syndrome: Nosology and Reproducibility of Placental Reaction Patterns. *Pediatr Dev Pathol*. (2003) 6:435–448.
158. Parodi A, De Angelis LC, Re M, et al. Placental Pathology Findings and the Risk of Intraventricular and Cerebellar Hemorrhage in Preterm Neonates. *Front Neurol*. 2020 Aug 14;11:761.
159. Luciano AA, Yu H, Jackson LW, Wolfe LA, Bernstein HB. Preterm labor and chorioamnionitis are associated with neonatal T cell activation. *PLoS One*. 2011 Feb 8;6(2):e16698.
160. Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S29-52.
161. Helmo FR, Alves EAR, Moreira RAA, et al. Intrauterine infection, immune system and premature birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2018 May;31(9):1227-1233.
162. Salas AA, Faye-Petersen OM, Sims B, et al. Histological characteristics of the fetal inflammatory response associated with neurodevelopmental impairment and death in extremely preterm infants. *J Pediatr*. 2013 Sep;163(3):652-7.e1-2.
163. Ylijoki M, Ekholm E, Haataja L, Lehtonen L; PIPARI study group. Is chorioamnionitis harmful for the brain of preterm infants? A clinical overview. *Acta Obstet Gynecol Scand*. (2012) 91:403–419.
164. Wu YW, Colford JM Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy: A meta-analysis. *JAMA*. 2000 Sep 20;284(11):1417-24.
165. Maisonneuve E, Ancel PY, Foix-L'Hélias L, Marret S, Kayem G. Impact of clinical and/or histological chorioamnionitis on neurodevelopmental outcomes in preterm infants: A literature review. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. 2017 Apr;46(4):307-316.

166. Goldenberg RL, McClure EM. Placental inflammation, neonatal death and cerebral palsy in preterm infants: is there a relationship? *BJOG*. 2016 Nov;123(12):1964.
167. Redline RW. Classification of placental lesions. *Am J Obstet Gynecol*. 2015 Oct;213(4 Suppl):S21-8. doi: 10.1016/j.ajog.2015.05.056. PMID: 26428500.
168. Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005;4:Article17.
169. Pei G, Chen L, Zhang W. WGCNA Application to Proteomic and Metabolomic Data Analysis. *Methods Enzymol*. 2017;585:135-158.
170. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008 Dec 29;9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559. PMID: 19114008; .
171. Tsuji, M., Saul, J.P., du Plessis, A., Eichenwald, E., Sobh, J., Crocker, R., Volpe, J.J., 2000. Cerebral intravascular oxygenation correlates with mean arterial pressure in critically ill premature infants. *Pediatrics* 106, 625–632.
172. Valverde, F. “Golgi Atlas of the Postnatal Mouse Brain.” *Golgi Atlas of the Postnatal Mouse Brain* (1998).
173. Juliano C, Sosunov S, Niatetskaya Z, Isler JA, Utkina-Sosunova I, Jang I, Ratner V, Ten V. Mild intermittent hypoxemia in neonatal mice causes permanent neurofunctional deficit and white matter hypomyelination. *Exp Neurol*. 2015 Feb;264:33-42.
174. Cheong JLY, Anderson PJ, Burnett AC, Roberts G, Davis N, Hickey L, et al. . Changing neurodevelopment at 8 years in children born extremely preterm since the 1990s. *Pediatrics*. (2017) 139:e20164086.
175. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF et al. Eunice kennedy shriver national institute of child health and human development. Neonatal Research Network. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993–2012. *JAMA*. (2015) 314:1039–51.
176. Steggerda SJ, Leijser LM, Wiggers-de Bruïne FT, et al. Cerebellar injury in preterm infants: incidence and findings on US and MR images. *Radiology*. (2009) 252(1):190–9.
177. Mukerji A, Shah V, Shah PS. Periventricular/Intraventricular Hemorrhage and Neurodevelopmental Outcomes: A Meta-analysis. *Pediatrics*. (2015) 136:1132–1143.
178. Parodi A, Rossi A, Severino M, et al. Accuracy of ultrasound in assessing cerebellar haemorrhages in very low birthweight babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. (2015) 100(4):F289–F292.
179. Bolisetty S, Dhawan A, Abdel-Latif M, et al. Intraventricular hemorrhage and neurodevelopmental outcomes in extreme preterm infants. *Pediatrics*. (2014) 133:55–62.

180. Paneth N, Rudelli R, Kazam, Monte W. The pathology of germinal matrix/ intraventricular hemorrhage. In: Paneth N, Rudelli R, Kazam, Monte W, eds. Brain damage in the preterm infant. Clinics in developmental medicine, No. 131, 1 ed. London, UK: Mac Keith P.
181. Ghazi-Birry HS, Brown WR, Moody DM, et al. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1997 (18):219 –229.
182. Petäjä J, Hiltunen L, Fellman V. Increased risk of intraventricular hemorrhage in preterm infants with thrombophilia. *Pediatr Res.* 2001 49(5):643-646.
183. Ramenghi LA, Gill BJ, Tanner SF, et al. Cerebral venous thrombosis, intraventricular haemorrhage and white matter lesions in a preterm newborn with factor V (Leiden) mutation. *Neuropediatrics.* 2002 (33):97–99.
184. Hartel C, Konig I, Koster S, et al. Genetic polymorphisms of hemostasis genes and primary outcome of very low birth weight infants. *Pediatrics* (2006) 118: 683-689.
185. Szpecht D, Wiak K, Braszak A, et al. Role of selected cytokines in the etiopathogenesis of intraventricular hemorrhage in preterm newborns. *Childs Nerv Syst.* (2016) 32(11):2097-2103.
186. Bilguvar K, DiLuna ML, Bizzarro MJ, et al. COL4A1 mutation in preterm intraventricular hemorrhage. *J Pediatr* (2009) 155: 743-745.
187. Lu H, Wang Q, Lu J, Zhang Q, Kumar P. Risk Factors for Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants Born at 34 Weeks of Gestation or Less Following Preterm Premature Rupture of Membranes. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* (2016) 25:807–12.
188. Catov JM, Scifres CM, Caritis SN, et al. Neonatal outcomes following preterm birth classified according to placental features. *Am J Obstet Gynecol.* (2017) 216:411.e1–14.
189. Soraisham AS, Singhal N, McMillan DD, Sauve RS, Lee SK; Canadian Neonatal Network. A multicenter study on the clinical outcome of chorioamnionitis in preterm infants. *Am J Obstet Gynecol.* (2009) 200(4):372.e1–372.e3726.
190. Villamor-Martinez E, Fumagalli M, et al. Chorioamnionitis is a risk factor for intraventricular hemorrhage in preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *Front Physiol.* (2018) 9:1253.
191. Granger C, Spittle AJ, Walsh J, et al. Histologic chorioamnionitis in preterm infants: correlation with brain magnetic resonance imaging at term equivalent age. *BMC Pediatr.* 2018;18:63.
192. Bierstone D, Wagenaar N, Gano DL, et al. Association of Histologic Chorioamnionitis With Perinatal Brain Injury and Early Childhood Neurodevelopmental Outcomes Among Preterm Neonates. *JAMA Pediatr.* (2018) 172:534–541.

193. Chau V, McFadden DE, Poskitt KJ, Miller SP. Chorioamnionitis in the pathogenesis of brain injury in preterm infants. *Clin Perinatol.* (2014) 41:83-103.
194. Gantert M, Been JV, Gavilanes AW, et al. Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus?. *J Perinatol.* (2010) 30:S21–S30.
195. Viscardi RM, Muhumuza CK, Rodriguez A, et al. Inflammatory markers in intrauterine and fetal blood and cerebrospinal fluid compartments are associated with adverse pulmonary and neurologic outcomes in preterm infants. *Pediatr Res.* 2004 Jun;55(6):1009-17
196. Stolp HB, Ek CJ, Johansson PA, et al. Factors involved in inflammation-induced developmental white matter damage. *Neurosci Lett.* (2009) 451(3):232–6.
197. Lawrence SM, Wynn JL. Chorioamnionitis, IL-17A, and fetal origins of neurologic disease. *Am J Reprod Immunol.* (2018) 79(5):e12803.
198. Stark MJ, Hodyl NA, Belegar VK, Andersen CC. Intrauterine inflammation, cerebral oxygen consumption and susceptibility to early brain injury in very preterm newborns. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2015) 101: F137–142.
199. Yanowitz TD, Potter DM, Bowen A, et al. Variability in cerebral oxygen delivery is reduced in premature neonates exposed to chorioamnionitis. *Pediatr Res.* (2006) 59:299–304.
200. Edwards AD, Tan S. Perinatal infections, prematurity and brain injury. *Curr Opin Pediatr* (2006)18:119–24.
201. Tortora D, Severino M, Malova M, et al. Differences in subependymal vein anatomy may predispose preterm infants to GMH-IVH. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* (2018) 103:F59–F65.
202. Haldipur P, Dang D, Millen KJ. Embryology. *Handb Clin Neurol.* (2018) 154:29–44.
203. Limperopoulos C, Soul JS, Gauvreau K, et al. Late gestation cerebellar growth is rapid and impeded by premature birth. *Pediatrics.* 2005;115:688–695.
204. Humberg A, Härtel C, Paul P, et al. Delivery mode and intraventricular hemorrhage risk in very-low-birth-weight infants: Observational data of the German Neonatal Network. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* (2017) 212:144–149.
205. Vesoulis ZA, Herco M, Mathur AM. Divergent risk factors for cerebellar and intraventricular hemorrhage. *J Perinatol.* (2018) 38(3):278–284.
206. Malloy MH. Impact of cesarean section on neonatal mortality rates among very preterm infants in the United States, 2000-2003. *Pediatrics.* (2008) 122:285–292.
207. Dani C, Poggi C, Bertini G, et al. Method of delivery and intraventricular haemorrhage in extremely preterm infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* (2010) 23:1419–1423.
208. Wyckoff MH, Salhab WA, Heyne RJ, et al. Outcome of extremely low birth weight infants who received delivery room cardiopulmonary resuscitation. *J Pediatr.* (2012) 160(2):239–44.e2.

209. Handley SC, Sun Y, Wyckoff MH, et al. Outcomes of extremely preterm infants after delivery room cardiopulmonary resuscitation in a population-based cohort. *J Perinatol* (2017) 35: 379–383.
210. Arnon S, Dolfen T, Reichman B, et al. Delivery room resuscitation and adverse outcomes among very low birth weight preterm infants. *J Perinatol*. (2017) 37(9):1010–6.
211. Sauer CW, Kong JY, Vaucher YE, et al. Intubation Attempts Increase the Risk for Severe Intraventricular Hemorrhage in Preterm Infants-A Retrospective Cohort Study. *J Pediatr*. (2016) 177:108–13.
212. Helwich E, Rutkowska M, Bokinić R, et al. Intraventricular hemorrhage in premature infants with Respiratory Distress Syndrome treated with surfactant: incidence and risk factors in the prospective cohort study. *Dev Period Med*. (2017).
213. Faust K, Härtel C, Preuß M, et al. Short-term outcome of very-low-birthweight infants with arterial hypotension in the first 24 h of life. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2015;100:F388.
214. Fanaroff AA, Fanaroff JM. Short- and long-term consequences of hypotension in ELBW infants. *Semin Perinatol*. 2006;30:151.
215. Vesoulis ZA, Herco M, El Ters NM, et al. Cerebellar hemorrhage: a 10-year evaluation of risk factors. *J Matern Fetal Neonatal Med*. (2019) 1–9.
216. Vesoulis ZA, Mathur AM. Cerebral Autoregulation, Brain Injury, and the Transitioning Premature Infant. *Front Pediatr*. 2017;5:64.
217. Fumagalli M, Bassi L, Sirgiovanni I, et al. From germinal matrix to cerebellar haemorrhage. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 8:2280–5.
218. Botkin ND, Kovtanyuk AE, Turova VL, et al. Direct modeling of blood flow through the vascular network of the germinal matrix. *Comput Biol Med*. 2018;92:147–155.
219. Intrapiromkul J, Northington F, Huisman TA, et al. Accuracy of head ultrasound for the detection of intracranial hemorrhage in preterm neonates: comparison with brain MRI and susceptibility-weighted imaging. *J Neuroradiol*. 2013;40:81-8.